

SÉRIE A, N° 4207

N° D'ORDRE : 5058

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Jacques WEPIERRE

1^{re} THÈSE. — Contribution à l'étude de la perméabilité cutanée à l'aide d'une substance lipophile, le *p*-cymène marqué au Carbone - 14.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 11 décembre 1963 devant la Commission d'examen.

M. J. André THOMAS	<i>Président.</i>
M. A. SOULAIRAC	} <i>Examineurs.</i>
M. J. STOLKOWSKI	

PARIS
IMPRIMERIE JOUVE

15, RUE RACINE, 15

1963

FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

Nom du Candidat : **WEPIERRE**

Prénom : **Jacques**

Date de la soutenance : 11 décembre 1963

Numéro d'ordre : Série A, 4207, N° 5058

1

WEPIERRE (Jacques). — Contribution à l'étude de la perméabilité cutanée à l'aide d'une substance lipophile, le *p*-cymène marqué au Carbone - 14. — Paris, 1963. Jouve, Éditeurs, in-8°, 152 pages.

Th. Sciences Naturelles, Paris, 1963.
Série A, 4207, N° 5058.

2

WEPIERRE (Jacques). — Contribution à l'étude de la perméabilité cutanée à l'aide d'une substance lipophile, le *p*-cymène marqué au Carbone - 14. — Paris, 1963. Jouve, Éditeurs, in-8°, 152 pages.

Th. Sciences Naturelles, Paris, 1963.
Série A, 4207, N° 5058.

3

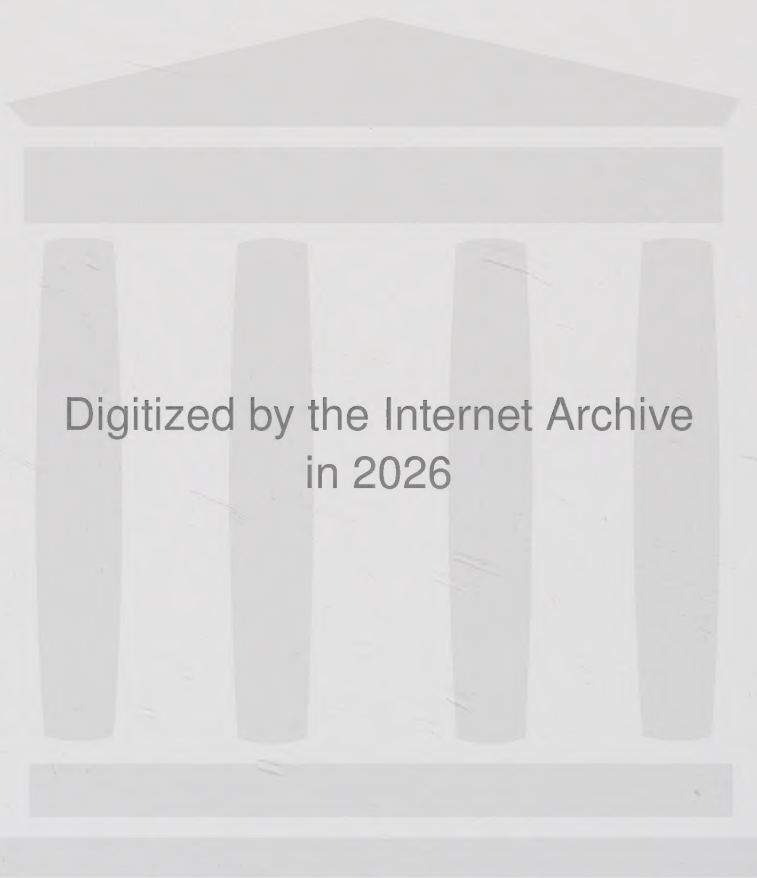
WEPIERRE (Jacques). — Contribution à l'étude de la perméabilité cutanée à l'aide d'une substance lipophile, le *p*-cymène marqué au Carbone - 14. — Paris, 1963. Jouve, Éditeurs, in-8°, 152 pages.

Th. Sciences Naturelles, Paris, 1963.
Série A, 4207, N° 5058.

4

WEPIERRE (Jacques). — Contribution à l'étude de la perméabilité cutanée à l'aide d'une substance lipophile, le *p*-cymène marqué au Carbone - 14. — Paris, 1963. Jouve, Éditeurs, in-8°, 152 pages.

Th. Sciences Naturelles, Paris, 1963.
Série A, 4207, N° 5058.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Jacques WEPIERRE

1^{re} THÈSE. — Contribution à l'étude de la perméabilité cutanée à l'aide d'une substance lipophile, le *p*-cymène marqué au Carbone – 14.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 11 décembre 1963 devant la Commission d'examen.

M. J. André THOMAS *Président.*

M. A. SOULAIRAC
M. J. STOLKOWSKI } *Examineurs.*

PARIS
IMPRIMERIE JOUVE

15, RUE RACINE, 15

—
1963



FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

PROFESSEURS

Doyen M. ZAMANSKY

G. JULIA	T	Analyse supérieure et Algèbre supérieure.	CHOUARD	T	Physiologie végétale.
PRENANT	T	Anatomie et Histologie comparée.	MALAVARD	T	Aviation (Techn. Aéro-naut.).
GRASSÉ	T	Evolution des êtres organisés.	BRELOT	T	Calcul diff. et Intégral.
PRÉVOST	T	Chimie organique.	NORMANT	T	Chimie organique.
WYART	T	Minéralogie et Cristallogr.	BÉNARD	T	Chimie minérale.
TEISSIER	T	Zoologie.	BUVAT	T	Botanique (E. N. S.).
MANGENOT	T	Biologie vég. (Orsay).	DUGUÉ	T	Statistiques Mathématiques.
AUGER	T	Physique quantique et Relativité.	SOULAIRAC	T	Psychophysiologie.
MONNIER	T	Physiologie générale.	ULRICH	T	Physiologie végétale.
PIVETEAU	T	Paléontologie.	MARÉCHAL	T	Optique théorique et appliquée.
ROCARD	T	Physique (E. N. S.).	KIRRMANN	T	Théories Chimiques.
CARTAN	T	Mathématiques (E. N. S.).	CHADEFAUD	T	Botanique.
LAFFITTE	T	Chimie générale.	M ^{lle} LE BRETON	T	Physiol. de la nutrition.
FAVARD	T	Géométrie supérieure.	LELONG	T	Application de l'analyse à la géométrie.
COULOMB	T	Physique du Globe.	DEVILLERS	T	Anatomie et Histologie comparées.
M ^{lle} COUSIN	T	Biol. animale (S.P.C.N.).	EHRESMAN	T	Topologie Algébrique.
CHRÉTIEN	T	Chimie minérale.	FRANÇON	T	Physique (S. P. C. N.).
DRACH	T	Zoologie.	GLANCEAUD	T	Géographie physique et Géologie dynamique.
KASTLER	T	Physique (E. N. S.).	GODEMENT	T	Mathématiques (M.P.C.).
EPHRUSSI	T	Génétique.	PISOT	T	Tech. Math. de la Phys.
RIVIÈRE	T	Géologie (S.P.C.N.) et Sédim.	ROCH	T	Géologie.
GAUTHERET	T	Biologie vég. (P. C. B.).	SCHATZMAN	T	Astrophysique.
LUCAS R.	T	Recherches Physiques.	TERMIER	T	Paléontologie stratig.
THOMAS A.	T	Biologie cellulaire.	ZAMANSKY	T	Mathématiques générales.
ARNULF	T	Optique appliquée.	LENNUIER	T	Physique (M. G. P.).
MORAND	T	Physique Enseignement.	RIZET	T	Génétique
SOLEILLET	T	Physique (P. C. B.).	ROUTHIER	T	Géologie appliquée.
FORTIER	T	Mécan. expérimentale des Fluides.	M ^{me} TONNELAT	T	Physique théorique.
DANJON	T	Astronomie.	DIXMIER	T	Mathématiques (M.P.C.).
PETIT	T	Biologie maritime.	SOUCHAY	T	Chimie générale.
QUENEY	T	Météorologie et dynamique atmosphérique.	AIGRAIN	T	Electrotechnique génér.
GALLIEN	T	Embryologie.	BRUSSET	T	Chimie systématique.
EICHHORN	T	Botanique.	M. LÉVY	T	Physique théorique des hautes énergies (Orsay).
DE CUGNAC	T	Biologie Vég. (S.P.C.N.).	M ^{me} CHAIX	T	Chimie biologique.
M ^{lle} CAUCHOIS	T	Chimie Physique.	M ^{me} HUREL-PY	T	Biologie végétale (P.C.B.).
THELLIER	T	Physique du Globe.	PIAUX	T	Chimie (M. P. C.).
L'HÉRITIER	T	Biologie Génér. (Orsay).	BRUN	T	Mécan. théorique des Fluides.
GRIVET	T	Radioélectricité (Orsay).	LEDERER	T	Chimie biologique.
PONCIN	T	Mécanique Générale.	M ^{me} DUBREIL	T	Mathématiques (Agrég.).
DUBREIL	T	Arithmétique et Théorie des Nombres.	M ^{me} HUREL	T	Mathémat. II (E.N.S.).
QUELET	T	Chimie organique.	BELLAIR	T	Géologie (S. P. C. N.).
CAGNIARD	T	Géophysique appliquée.	COTTE	T	Physique électricité.
CHAMPETIER	T	Chimie macromoléculaire.	DUBOIS J. E.	T	Chimie organique.
CUVILLIER	T	Micropaléontologie.	LAMOTTE	T	Zoologie (E. N. S.).
JUNG	T	Pétrographie.	MICHEL A.	T	Chimie minérale (Orsay).
TRILLAT	T	Microscopie et diffraction électronique.	OLMER	T	Energétique générale.
WIEMANN	T	Chimie org. et structurale.	ROUAULT	T	Electricité (Orsay).
JACQUINOT	T	Spectroscopie et Physique céleste (Orsay).	GAUTHIER	T	Mécanique appliquée.
VASSY	T	Physique de l'atmosphère.	BARCHEWITZ	T	Chimie physique.
DESTOUCHES	T	Théories Physiques.	BROSSEL	T	Physique atomique.
AMIEL	T	Chimie générale.	BUSER	T	Physiologie comparée.
HOCART	T	Minéralogie et Cristallogr.	CAMUS	T	Physiol. vég. (B.M.P.V.).
J. P. MATHIEU	T	Physique optique.	CASTAING	T	Physique II Thermod. (Orsay).
COUTEAUX	T	Biol. animale (P. C. B.).	CURIEN	T	Minéralog. et Cristallogr.
MAY	T	Zoologie (Orsay).	MOYSE	T	Physiol. végét. (Orsay).
CHOQUET	T	Théorie des fonctions et Topologie.	NOIROT	T	Evolution des êtres org.
FELDMANN	T	Biologie végétale marine.	PANNETIER	T	Chimie générale.
GUINIER	T	Physique des Solides (Orsay).	POSSOMPES	T	Zoologie.
JOST	T	Physiologie comparée.	PULLMANN	T	Chimie quantique.
FORTET	T	Calcul des Probabilités et Physique mathém.	TEILLAC	T	Physique Nucléaire et Radioactivité.
SCHARTZ	T	Calcul diff. et Intégral.	TONNELAT	T	Biologie physico-chim.
			VILLE	T	Econométrie.
			WILLEMART	T	Chimie (P. C. B.).
			DODE	T	Chimie (Orsay).

FREYMANN	T	Recherches Physiques.	M ^{lle} FOURCROY	Biol. Végétale (S.P. C.N.).
GUINOCHET	T	Biologie vég. S.P.C.N. (Orsay).	M ^{me} CHOQUET-BRU-	T Mécan. Analytique et
ROLLET	T	Chimie minérale.	HAT	Mécanique céleste.
M ^{lle} JOSIEN	T	Chimie (S. P. C. N.).	M ^{lle} VEIL	Physiologie Générale.
CHEVALLEY	T	Géométrie algébrique et théorie des groupes.	LWOFF	T Microbiologie.
ARNOULT	T	Electronique (Orsay).	SIESTRUNCK	T Mécanique physique et expérimentale.
CHAPELLE	T	Physique (Orsay).	LACOMBE	T Métallurgie des métaux nucléaires.
DELANGE	T	Mathématiques I (Orsay).	BROCHARD	T Physique P. C. B. (Orsay).
DENY	T	Mathématiques Générales. (Orsay).	CABANNES	T Mécanique générale.
GERMAIN	T	Mécanique théorique des fluides.	LESIEUR	T Mathématiques I (Orsay).
LUCAS G.	T	Géologie.	MAZET	T Mécanique générale (Orsay).
ALLARD	T	Chimie Physique.	CAIRE	Géographie physique et Géolog. dynamique.
BERTHELOT	T	Phys. des partic. fond.	COMOLET	T Mécanique des fluides.
BRICART	T	Météor. et Phys. de l'Atmosphère.	CORABOEUF	Physiol. animale (Orsay).
M ^{me} ALBE-FESSARD	T	Psychophysiologie.	DELLOUE	Physique de l'exosphère.
FRIEDEL	T	Physique des Solides (Orsay).	GORENFLOT	Botanique II (Orsay).
M. JULIA	T	Etudes des Moléculaires naturelles complexes.	HOUILLOIN	Biol. animale (P.C.B.).
LENDER	T	Biologie Animale S. P. C. N. (Orsay).	JULLIEN J.	Chimie S.P.C.N. (Orsay).
MAGAT	T	Physico-chimie des radioéléments.	MALGRANGE	T Technique Math. de la Physique (Orsay).
M ^{lle} QUINTIN	T	Electrochimie.	OLIVIER	Antropologie.
MONOD	T	Chimie du métabolisme.	NOZERAN	T Botanique II (Orsay).
BENOIT	T	Physiol. anim. (Orsay).	BLANC-LAPIERRE	T Physique E.N.S. (Orsay).
DE POSSEL	T	Analyse numérique.	CHEVAUGEON	T Botanique (Orsay).
CHARLOT	T	Chimie analytique.	KAHANE	T Mathématiques (Orsay).
LEMÉE	T	Physiol. vég. B. M. P. V. (Orsay).	SAMUEL	T Mathématique E. N. S. féminine.
GUÉRIN	T	Chimie M.P.C. (Orsay).	KOURGANOFF	T Astronomie (Orsay).
CHATELET M.	T	Chimie (P. C. B.).	THIERY	T Mécanique céleste.
JEAN	T	Physique nucl. (Orsay).	ABELES	Physique (S.P.S.C.N.).
MATTLER	T	Physique (S.P.C.N.).	AMAT	Physique (P.C.B.).
BERGERARD	T	Zoologie (Orsay).	AUBOIN	Géologie.
BERTIN	T	Electronique (Orsay).	M ^{me} BENOIT-GUEU-	Physique Nucl. et radio-
BOUSSIÈRES	T	Chimie des Radioéléments (Orsay).	TAL	activité.
M ^{me} COUTURE	T	Thermodynamique et Mécanique Physique.	BOUGIS	Biologie marine (Villefranche-sur-mer).
ELLENBERGER	T	Géologie des grandes régions du globe.	BRUHAT	T Mathématiques (M.P.C.).
FRANC	T	Biol. Animale (P. C. B.).	BRUNN	T Géologie hist. (Orsay)
SCHNELL	T	Bot. tropicale (Orsay).	CHABBAL	Physique M.G.P. (Orsay).
STOLKOWSKI	T	Physiologie végétale.	DEHEUVELS	T Mathématique Propé. (Orsay).
ACHER	T	Chimie Biol. (Orsay).	D'ESPAGNAT	Physique théor. (Orsay).
BAUDOIN	T	Biol. animale (P.C.B.).	FURON	Géologie (S.P.C.N.).
BEAUMONT	T	Biol. animale (S.P.C.N.).	M ^{me} GANS	T Génétique.
BLAUMONT	T	Géophysique ionosphère.	GENEVES	Biologie végétale (P.C.B.).
BOURREAU	T	Botanique.	GUILBERT	Physique (C.U.S. Orléans).
CURIE D.	T	Physique (M. G. P.).	HUPE	Pétrographie.
DURAND-DELGA	T	Géologie.	HOLLANDE	T Biologie générale.
FRÉON	T	Chimie Org. (Orsay).	LIONS	T Analyse numérique.
HELLER	T	Physiologie végétale.	MAITTE	Chimie (P.C.B.).
TORTRAT	T	Calcul des Probabilités.	MEYER	Physique propédeutique.
CAILLEUX	T	Géologie (S. P. C. N.).	NICOLAS	Géologie appliquée.
MAGNAN	T	Physique (S. P. C. N.).	PANGEL	Biologie générale.
DAUDEL	T	Mécanique ondulatoire appliquée à la chimie théorique et à la Physique nucléaire.	RAVIER	Pétrographie.
			ROSEAU	T Mécanique théorique des Fluides.
			ROUBINE	Electronique.
			SILBER	T Chimie (P.C.B.).
			UEBERSFELD	T Electronique.
			YVON	T Théories physiques.

Secrétaire Général.....R. POULLAIN.

A NOTRE PRÉSIDENT DE THÈSE

MONSIEUR J. ANDRÉ THOMAS

Professeur titulaire de la chaire de Biologie Cellulaire
de la Faculté des Sciences de Paris,

*qui a porté une sollicitude attentive à notre travail,
nous a aidé de ses conseils et nous a fait l'honneur
d'accepter la présidence du jury de cette thèse.*

*Qu'il trouve ici l'hommage de notre respectueuse
gratitude.*

A NOS JUGES

MONSIEUR A. SOULAIRAC

Professeur titulaire de la chaire de Psychophysiologie
de la Faculté des Sciences de Paris,

MONSIEUR J. STOLKOWSKI

Professeur de Physiologie Générale à la Faculté des Sciences de Paris,

*qui nous ont reçu avec beaucoup de sympathie et
ont accepté de faire partie de notre jury.*

*Qu'ils agréent l'expression de notre profonde recon-
naissance.*

A NOTRE MAÎTRE

MONSIEUR G. VALETTE

Doyen de la Faculté de Pharmacie de Paris
Professeur titulaire de Pharmacodynamie
de la Faculté de Pharmacie de Paris,

qui nous a chaleureusement accueilli dans son Laboratoire, nous a confié le sujet de cette thèse et nous a accordé avec bienveillance ses directives.

Qu'il veuille bien accepter le témoignage de notre respectueuse gratitude et de notre entier dévouement.

A MONSIEUR Y. COHEN

Maître de conférences Agrégé de la Faculté de Pharmacie de Paris,

qui n'a jamais cessé de nous prodiguer des encouragements et de nous guider judicieusement au cours de notre travail.

Qu'il soit assuré de notre fidèle reconnaissance et de notre réel attachement.

A MONSIEUR LE HAUT-COMMISSAIRE A L'ENERGIE ATOMIQUE

dont la bienveillance nous a permis d'effectuer un stage au Centre d'Etudes Nucléaires de Saclay et de disposer de moyens matériels efficaces.

A MONSIEUR C. FISCHER

Chef du Département des Radioéléments,

qui nous a accueilli dans ses Laboratoires du Centre d'Etudes Nucléaires de Saclay.

A MONSIEUR L. PICHAT

Chef de la section des Molécules Marquées,

*qui a accepté de mettre au point la synthèse du p-cymène ^{14}C et nous a donné des conseils avisés.
Qu'ils reçoivent ici l'assurance de notre très vive reconnaissance.*

A MES PARENTS

A MA FEMME

En faible gage de mon affection.

A MES AMIS

SOMMAIRE

INTRODUCTION	3
--------------------	---

PREMIÈRE PARTIE

HISTORIQUE ET TECHNIQUES

CHAPITRE PREMIER. — Structure de la peau, physiologie de l'absorption cutanée	5
I. — La peau, rappel anatomique	5
II. — Physiologie de la pénétration cutanée.....	9
III. — Relation entre les propriétés physico-chimiques des molécules et leur capacité de pénétration	13
IV. — Facteurs favorisant la perméabilité cutanée.....	15
CHAPITRE II. — Rappel des techniques de la radioactivité appliquées à l'étude de la perméabilité cutanée	22
I. — Mode de marquage des substances.....	22
II. — Techniques de détection	25
CHAPITRE III. — Description des méthodes personnelles d'étude	29
I. — Autoradiographie des substances marquées volatiles	29
II. — Minéralisation des composés organiques selon la technique de VAN SLYKE et FOLCH	33
III. — Méthode d'extraction du <i>p</i> -cymène contenu dans le sang	43
IV. — Détermination de la radioactivité des échantillons contenant du carbone 14.....	46
V. — Propriétés, synthèse et contrôle du <i>p</i> -cymène marqué au carbone 14.....	54

DEUXIÈME PARTIE

ÉTUDES QUALITATIVES DE LA PERMÉABILITÉ CUTANÉE

CHAPITRE IV. — Absorption percutanée du <i>p</i>-cymène chez diverses espèces animales	60
I. — Absorption à travers la peau de la Souris.....	60
II. — Absorption à travers la peau du Chien.....	63

III. — Absorption à travers la peau du Lapin.....	66
IV. — Absorption à travers la peau du raton nouveau-né...	67
V. — Discussion des résultats obtenus par autoradiographie	73
CHAPITRE V. — Etude comparée du passage du <i>p</i> -cymène à travers la peau et d'autres barrières physiologiques.....	76
I. — Technique	76
II. — Résultats	78
III. — Analyse des résultats	84
A) Localisation et élimination du <i>p</i> -cymène et de ses métabolites	84
B) Pénétration à travers les barrières physiologiques ..	85
CHAPITRE VI. — Comparaison de la pénétration cutanée du <i>p</i> -cymène et d'autres substances	88
I. — Mode opératoire	88
— Cas de l'iode	88
— Cas de l'acide <i>p</i> -isopropylbenzoïque	89
— Cas du squalane	89
II. — Résultats	91
 TROISIÈME PARTIE 	
ÉTUDES QUANTITATIVES DE LA PERMÉABILITÉ CUTANÉE	
CHAPITRE VII. — Résorption et dégradation du <i>p</i> -cymène	96
I. — Résorption péritonéale et élimination urinaire et fécale	96
II. — Résorption et élimination pulmonaire	99
III. — Dégradation sanguine et hépatique <i>in vitro</i>	103
IV. — Tentative d'identification des produits de dégradation	107
V. — Discussion des résultats.....	110
CHAPITRE VIII. — Mesure de la résorption sanguine et lymphatique	113
I. — Résorption sanguine chez le Lapin.....	113
II. — Résorption lymphatique chez le Rat.	119
CHAPITRE IX. — Mesure globale de la pénétration cutanée chez la Souris.....	123
I. — Technique	123
II. — Résultats	124
CHAPITRE X. — Discussion générale.....	129
CONCLUSIONS GÉNÉRALES	139

INTRODUCTION

Le rôle fondamental de la peau est d'assurer la protection de l'organisme animal vis-à-vis du milieu extérieur. Le tégument, dans les conditions physiologiques est donc bien plus un isolant qu'une surface absorbante. Pourtant, l'emploi en thérapeutique de divers médicaments, qui, administrés sous forme de pommades exercent une action pharmacologique générale, et les accidents toxiques provoqués par les substances de contact telles que les insecticides (DDT ou composés organo-phosphorés) et par les solvants industriels (benzène) sont la preuve de la traversée de la barrière cutanée par de nombreux composés. Ces quelques exemples montrent la nécessité de bien connaître les modalités de l'absorption et les facteurs qui favorisent le passage à travers la peau. Cependant les difficultés techniques rencontrées pour étudier la perméabilité cutanée font que son analyse est encore très incomplète. En effet, les molécules appliquées sur la peau pénètrent le plus souvent en quantités faibles, ce qui rend leur dosage dans l'organisme délicat, c'est pourquoi, les chercheurs ont fréquemment utilisé des traceurs faciles à détecter (colorants ou composés physiologiquement actifs) incorporés aux substances étudiées pour en suivre le cheminement; mais, l'interprétation des résultats ainsi obtenus peut donner prise à la critique, du fait qu'il n'est pas certain que la substance traceuse et son véhicule suivent le même sort dans la peau et au sein de l'organisme. Depuis quelques années, l'utilisation en biologie des molécules marquées à l'aide des radio-isotopes a été mise à profit en physiologie cutanée, ce qui a permis d'éliminer la plupart des difficultés précédentes, car ces composés sont dosables à l'état de traces dans les tissus et ils rendent possible une analyse directe de l'absorption avec une précision satisfaisante et une grande sécurité dans les déductions.

Ces différentes considérations nous ont amené à entreprendre l'analyse de la perméabilité de la peau vis-à-vis des substances lipophiles et plus particulièrement du *p*-cymène (méthyl-para-isopropylbenzène), en effet, cette substance s'est révélée être un composé qui favorise l'absorption de nombreux médicaments (VALETTE). Comme le *p*-cymène est dépourvu de propriétés qui permettent sa détection facile dans les tissus, nous avons utilisé une molécule marquée au carbone 14.

Dans ce travail, mené sur l'animal vivant, il nous a semblé impor-

tant de distinguer deux phases dans la pénétration cutanée : tout d'abord, une phase d'absorption à travers l'épiderme dans le derme pour laquelle nous avons recherché les rôles respectifs des couches épidermiques et des formations pilo-sébacées, puis une phase de résorption par le sang et la lymphe qui aboutit à la distribution dans l'organisme.

Cette idée n'a pu être dégagée qu'en étudiant simultanément d'autres phénomènes qui nous ont conduits à diviser ce mémoire en trois parties.

La première partie est consacrée à un bref historique concernant les recherches antérieures sur la perméabilité cutanée et plus particulièrement les acquisitions obtenues à l'aide des radioisotopes. Nous exposons ensuite les méthodes d'analyse de la pénétration en utilisant les molécules marquées, pour terminer par la description de nos techniques personnelles.

La deuxième partie concerne l'étude qualitative de la perméabilité cutanée. Nous recherchons les voies de passage du *p*-cymène dans la peau de diverses espèces animales, puis nous comparons, d'une part, la pénétration à travers la barrière cutanée à l'absorption à travers différentes membranes physiologiques, d'autre part, les modalités de l'absorption du *p*-cymène et de diverses substances lipophiles.

La dernière partie comporte une analyse quantitative du métabolisme du méthyl-para-isopropylbenzène qui nous permet ensuite d'apprécier l'importance du sang et de la lymphe dans la résorption dermique de ce composé, puis de mesurer globalement la vitesse de pénétration à travers la peau de la Souris.

En conclusion, nous essayons de tracer un tableau général de l'absorption cutanée des substances lipophiles.

PREMIÈRE PARTIE

HISTORIQUE ET TECHNIQUES

CHAPITRE I

STRUCTURE DE LA PEAU, PHYSIOLOGIE DE L'ABSORPTION PERCUTANÉE

Ces dernières années, l'étude de la structure et de la physiologie de la peau et plus particulièrement les problèmes en relation avec la pénétration cutanée ont fait l'objet d'ouvrages importants : ROTHMAN (1954), MONTAGNA (1956 et 1962), et de nombreuses revues bibliographiques parmi lesquelles nous pouvons citer celles de SHELLEY et ARTHUR (1958), LOBITZ et DANIELS (1961), HERXHEIMER (1961) et BARR (1962). Après un bref rappel sur la structure de la peau, nous bornerons le plus souvent notre étude aux dernières acquisitions concernant la perméabilité de la peau en insistant plus particulièrement sur les résultats obtenus à l'aide des radioisotopes.

I. — LA PEAU : RAPPEL ANATOMIQUE

La peau joue un rôle fondamental dans la protection des organismes vis-à-vis du milieu extérieur, sa structure et sa composition chimique en font un revêtement imperméable à de nombreuses substances, elle participe également à la régulation de la température corporelle, à la sensibilité tactile, thermique et douloureuse par les éléments sensoriels qu'elle renferme. Elle possède une fonction d'excrétion dévolue aux formations sébacées et sudoripares.

A) Structure de la peau

La peau est un organe qui représente 5 p. 100 du poids de l'homme MORELLE (1957). Elle est essentiellement constituée par l'épiderme,

le derme et l'hypoderme auxquels sont associés les appareils pilosébacés et les glandes sudoripares.

a) L'ÉPIDERME

L'épiderme est un épithélium pavimenteux stratifié dont les cellules, par le processus de kératinisation, se différencient peu à peu de la profondeur vers la surface en une matière cornée. Il est possible d'y distinguer deux parties, le corps muqueux de Malpighi formé par les couches profondes vivantes et la couche cornée constituée par les cellules kératinisées mortes.

— *Le corps muqueux de Malpighi.*

La couche basale ou germinative faite d'une seule assise de cellules cubiques est surmontée par la couche des cellules à épines (*stratum spinosum*) d'épaisseur variable (6 à 20 assises cellulaires) selon la position des papilles dermiques qui s'y enfoncent. Les cellules sont polyédriques en profondeur et s'aplatissent vers la surface. Elles sont séparées les unes des autres par des espaces intercellulaires dans lesquels circule un liquide interstitiel. Des anastomoses cytoplasmiques (ponts intercellulaires) par où passent les tonofibrilles établissent une continuité entre les cytoplasmes des différentes cellules et leur donnent un aspect épineux.

Au-dessus du *stratum spinosum* se différencie la couche granuleuse (*stratum granulosum*) constituée par quelques assises de cellules aplaties chargées de grains de kératohyaline, puis, plus superficiellement d'éléidine, composés chimiques de nature lipoprotéique considérés comme des substances mères de la kératine. Les noyaux présentent des signes d'altération et les tonofibrilles se ramassent dans les cellules tandis que les ponts intercellulaires disparaissent. Dans les épidermes épais tels que ceux de la plante des pieds, il est possible de mettre en évidence la couche brillante (*stratum lucidum*) qui marque le début de la couche cornée constituée de cellules d'aspect vitreux dans lesquelles les tonofibrilles s'imprègnent de kératine et dont le cytoplasme, peu à peu déshydraté, se charge de lipides et d'éléidine. La détection histochimique de la fonction sulfhydrile (GIROUD et BULLIARD, 1930), montre que la kératinisation s'accompagne de la disparition des nombreux groupements thiols présents dans la couche granuleuse au niveau de la kératohyaline au profit de liaisons disulfure qui disparaissent à leur tour dans les cellules kératinisées.

— *La couche cornée (stratum corneum).*

D'épaisseur très variable selon la région envisagée, la couche cornée est formée de cellules aplaties, réduites à une enveloppe imprégnée de kératine et de lipides, qui perdent tout lien entre elles et se détachent de la peau au niveau de la couche desquamante.

b) LE DERME

Le derme est un tissu conjonctif fibreux qui assure par une abondante vascularisation la nutrition de l'épiderme. Son épaisseur varie selon les régions. On peut y distinguer, sous l'épiderme, la couche papillaire, la couche planiforme et la couche tendiniforme. Le derme est riche en fibres collagènes plus ou moins enchevêtrées, il renferme des fibrocytes, de nombreuses cellules migratrices, des vaisseaux sanguins et lymphatiques surtout au niveau des papilles. Les follicules pileux et les glandes cutanées sont inclus dans ces formations qui renferment en outre les corpuscules du tact et les terminaisons nerveuses de la sensibilité cutanée.

e) L'HYPODERME

L'hypoderme est un tissu d'une épaisseur très variable de nature conjonctive lâche avec de rares fibres collagènes et élastiques. La substance fondamentale est plus ou moins infiltrée de graisses sous forme de pannicules adipeux. Il contient le fond des follicules pileux et les glomérules des glandes sudoripares.

d) L'APPAREIL PILO-SÉBACÉ

— *Le poil.*

Le poil prend naissance au fond d'une invagination de l'épiderme, le follicule pileux où il s'insère par son bulbe sur une saillie conjonctive, la papille du poil. La gaine épithéliale interne entoure le poil depuis sa base jusqu'à l'orifice des glandes sébacées. La face interne du follicule pileux, prolongement de l'épiderme de Malpighi, forme la gaine épithéliale interne qui s'amincit vers le bas pour ne comporter au niveau de la papille qu'une seule assise cellulaire correspondant à la couche basale de l'épiderme.

La croissance du poil qui aboutit à un processus de kératinisation de bas en haut analogue à celui de l'épiderme, présente un caractère cyclique, sauf dans certains cas (cuir chevelu, laine de moutons). Chez le Rat, par exemple (BUTCHER 1934), la durée de vie des poils est voisine de un mois. Après un stade de prolifération où la croissance du poil est rapide, survient une période de repos accompagnée de l'atrophie de la papille et de l'arrêt du développement, qui aboutit à la chute du poil ; simultanément un nouveau germe se forme pour donner naissance à un autre poil.

— *Les glandes sébacées.*

Ces glandes sont le plus souvent annexées à un poil dont la gaine épithéliale externe émet un diverticule qui constitue la glande sébacée. Elles sont de nature holocrine : leurs parois sont formées

d'une membrane basale tapissée d'une couche de cellules germinatives qui évoluent vers le centre en se chargeant de gouttelettes lipidiques en même temps que les noyaux disparaissent. Ces cellules se fragmentent en constituant le sébum qui s'élimine dans le follicule pileux par un canal excréteur court à paroi mince.

e) LES GLANDES SUDORIPARES

Chez l'homme, les glandes sudoripares tubuleuses de type eccrine, s'enfoncent profondément dans le tissu sous-cutané où elles s'enroulent. Elles secrètent la sueur formée d'eau, de sels et d'urée.

Chez les animaux, il existe également des glandes apocrines plus volumineuses enfoncées dans l'hypoderme et accolées à l'appareil pilo-sébacé ; leur sécrétion est formée par la partie apicale des cellules sécrétrices et contient une forte proportion de lipides.

Nous analyserons le rôle de chacune de ces structures dans la fonction de protection de la peau.

B) Chimie de la peau

Nous nous bornerons à l'étude sommaire de la kératine et des lipides cutanés.

a) LES KÉRATINES

Les kératines forment un vaste groupe de scléro-protéines dont la composition est variable selon l'espèce animale et la zone cutanée considérée (BLOCK, 1939). On y trouve une proportion de cystine d'autant plus importante que la kératinisation est plus intense. Certains auteurs ont établi une distinction entre les kératines des phanères ou eukératines qui contiennent 3 à 5 p. 100 de soufre et les kératines de l'épiderme ou pseudokératines qui ne renferment que 1 à 3 p. 100 de cet élément.

Les kératines ont une structure cristalline allongée analogue à celle des tonofibrilles. Elles sont formées de chaînes de polypeptides reliées par les nombreux ponts disulfures des groupements cystines. Ces liaisons contribuent à leur donner une résistance très grande aux différents agents d'hydrolyse (enzymes, acides, alcalis). Pourtant, après réduction des ponts disulfures par les sulfures alcalins ou le thioglycolate, les kératines deviennent hydrolysables. Ces mêmes groupements leur donnent une grande élasticité (HARRIS, 1949) et une souplesse importante surtout après hydratation. Celle-ci est facilitée par la capacité des kératines de fixer l'eau, (BLANCK, 1952, BLANCK et SHAPPIRO, 1955).

b) LES LIPIDES CUTANÉS

Les lipides rencontrés à la surface de la peau proviennent de la sécrétion sébacée, des cellules épidermiques au cours de la cornification et de la sécrétion des glandes holocrines. En pratique, il est très difficile de recueillir ces trois fractions. Néanmoins, il a été possible de montrer que les graisses épidermiques et le sébum contiennent une proportion d'acides gras libres allant jusqu'à 30 p. 100 des lipides totaux (MAC KENNA, WHEATLEY et WORMALL, 1950). Ces acides proviendraient de l'hydrolyse enzymatique (NICOLAIDES et WELLS, 1957) ou microbienne à la surface de la peau d'une partie des glycérides sécrétés ; en effet, ces lipides libèrent par saponification les mêmes acides gras que ceux rencontrés à l'état libre. La longueur de la chaîne carbonée des acides gras contenus dans les lipides du cuir chevelu (WEITKAMP, SMILJANIC et ROTHMAN, 1947) est comprise entre 7 et 22 atomes de carbone, avec une forte prépondérance pour les termes en C_{16} et C_{18} qui sont soit saturés, soit à une, deux ou trois doubles liaisons.

Les lipides cutanés contiennent une fraction insaponifiable constituée pour la moitié par du cholestérol qui provient des graisses épidermiques. Ces dernières renferment en effet dix fois plus de stérols que l'insaponifiable du sébum. Le cholestérol est plus abondant dans les couches inférieures que dans les assises superficielles de l'épiderme (1,56 et 0,73 p. 100 du poids sec). Par contre, la teneur en dérivés estérifiés passe de 1,8 p. 100 dans les couches basales à 18 p. 100 dans le *stratum corneum* (KOOYMAN, 1932). Parmi les précurseurs du cholestérol, il est intéressant de noter la présence dans la peau de squalène, hydrocarbure acyclique en $C_{30}H_{50}$ qui représente près de 5 p. 100 des lipides totaux (SOBEL, 1949 et MAC KENNA, WHEATLEY et WORMALL, 1950).

Enfin, il est possible de déceler des phospholipides dans les couches profondes de l'épiderme et dans les cellules périphériques des glandes sébacées (SNIDER, GOTTSCHALK et ROTHMAN, 1949, MONTAGNA, NOBACK et ZAK, 1947 et 1948).

Cette composition chimique explique que les graisses épidermiques permettent non seulement la dissolution des substances lipophiles mais encore, grâce à l'abondance du cholestérol, la traversée de l'eau et des solutions d'électrolytes par émulsion plus ou moins rapide.

II. — PHYSIOLOGIE DE LA BARRIÈRE CUTANÉE

Parmi tous les aspects de la physiologie cutanée nous n'envisageons que le rôle protecteur de la peau vis-à-vis des agents extérieurs, en nous attardant particulièrement sur sa traversée par différentes substances chimiques. Nous avons vu que la structure et les pro-

priétés de la peau en font une barrière efficace qui présente des zones de moindre résistance à l'orifice des follicules pileux et des glandes sébacées longtemps considérés comme les voies de passage des substances (HADGRAFT et SOMERS, 1956). Cependant différents faits expérimentaux nous montreront que dans certaines conditions l'épiderme peut être traversé directement.

Il convient avant de commencer cette étude de définir l'absorption percutanée.

1) Définition de l'absorption percutanée

L'expression « absorption percutanée » définit une pénétration des substances du milieu extérieur dans la peau intacte et à travers cette dernière dans le torrent circulatoire. Cette définition implique donc que les conditions physiologiques sont respectées et élimine les composés qui lèsent la peau tels que l'ypérite et la lewisite dont l'absorption à travers l'épiderme a été étudiée par AXELROD et HAMILTON (1947). Il est également nécessaire de distinguer entre l'absorption percutanée et une pénétration limitée aux couches les plus extérieures de l'épiderme sans qu'il y ait passage dans l'organisme.

2) La barrière pilo-sébacée

L'orifice des follicules pileux et des glandes sébacées sont des zones de faible résistance à la pénétration ; en effet seul le sébum et quelques assises cellulaires constituées par le fond du follicule pileux, les parois et les canaux excréteurs des glandes sébacées sont interposés comme protection entre le milieu extérieur et intérieur.

Le sébum est facilement traversé par toutes les substances lipophiles (VALETTE, 1954) mais il est également capable d'absorber, en les émulsionnant lentement, de faibles volumes de solution d'électrolytes et de substances hydro-solubles (SULZBERGER et HERRMANN, 1960). ROTHMAN (1954) attribue aux cellules de la paroi des formations pilo-sébacées une perméabilité plus importante que celle de l'épiderme.

3) La barrière épidermique

L'épiderme, riche en kératine et en graisses, présente aux agents de pénétration une résistance variable selon l'endroit considéré. SMITH, FISCHER et BLANK (1961) ont montré que, chez l'homme la peau abdominale est moins perméable que la peau du scrotum. GRIESEMER (1960) distingue dans l'épiderme un certain nombre de barrières physiques ou physiologiques.

- le film lipidique de la surface cutanée,
- la couche cornée,
- la zone barrière de Rein,
- la couche de Malpighi et la jonction dermo-épidermique.

— *Le film lipidique de la surface cutanée.*

Ce film discontinu riche en cholestérol est imperméable aux substances hydrosolubles mais il est capable de s'émulsionner avec leurs solutions. Cette propriété rend donc la barrière inefficace.

— *Le stratum corneum.*

La couche cornée peut absorber de grandes quantités de substances hydrophiles et lipophiles à la faveur des propriétés de la kératine et de sa richesse en lipides et cholestérol. Ce phénomène facilite l'absorption des composés appliqués sur la peau, par la création d'un fort gradient de concentration situé au-dessus des barrières sous-jacentes.

Le *stratum corneum* fixe certaines molécules de manière très énergique en empêchant leur pénétration plus profonde. C'est le cas de quelques agents tensio-actifs (BLANK et GOULD, 1959), de l'Iode et des Iodures (CREDNER, 1954, HAGMULLER, 1957, TAS et FEIGE, 1958), de l'acide stéarique marqué à l'Iode 131 (BUTCHER, 1953 b), dans la mesure où cet acide gras ne subit pas de déshalogénéation lors de son absorption. Des pellicules de *stratum corneum* humain excisé présentent une perméabilité plus faible dans les couches profondes que dans les couches superficielles pour certains dérivés liposolubles tels que l'alcool oléilique, l'acide oléique, l'acide linoléique, l'oléate et l'acétate de cholestéryle (WURSTER et DEMPSI, 1961).

Il semble donc que la couche kératinisée ne puisse pas s'opposer à la pénétration des composés, sauf dans quelques cas où elle les fixe par suite d'une affinité chimique, elle en retarde tout au plus l'absorption.

— *La zone barrière de REIN.*

REIN (1924) a situé à l'intérieur de l'épiderme, une barrière polarisée chargée négativement qui s'oppose au passage de l'eau et des électrolytes. Longtemps considérée comme le principal obstacle de l'absorption cutanée, cette zone s'est révélée perméable à différentes substances marquées, hydrocortisone ^{14}C (SCOTT et KALZ, 1956), Sarin ^{32}P (BLANK, GRIESEMER et GOULD, 1958), tributyl-phosphate ^{32}P (TREGGAR, 1961), qui empruntent aussi bien la voie d'absorption transépidermique que pilo-sébacée.

La localisation de cette barrière n'est pas bien définie. Pour ROTHMAN (1954), elle serait située entre l'épiderme corné et l'épiderme vivant, ce qui semble confirmé par différents auteurs. En effet SZAKALL (1951) et MALI (1956) en utilisant la technique d'arrachage des couches cornées à l'aide d'un ruban adhésif, préconisée par WOLF (1940) et PINKUS (1951), ont réussi à isoler cette zone par

un seul arrachage au niveau des couches cutanées situées entre le *stratum desquamans* et les cellules vivantes. Pourtant MONASH (1957) pense que la barrière est constituée par l'ensemble du *stratum corneum* ou tout au moins les deux tiers internes de celui-ci.

La nature de cette assise ne donne lieu qu'à des hypothèses. Pour ROTHMAN (1954) il s'agirait d'une double barrière électrique ayant une réaction acide à l'extérieur et alcaline à l'intérieur, d'après TREHERNE (1956) ce serait une structure de nature lipidique, tandis que pour (LOBITZ et DANIELS, 1961), ce serait un complexe très résistant d'acides mucopolysacchariques. GRIESEMER (1960) considère que cette membrane résulte d'une transition brutale entre les cellules vivantes et les cellules mortes ; il présume que la résistance à la pénétration dans cette région est due à des charges électriques apportées par les constituants des parois.

— La couche de Malpighi et la jonction dermo-épidermique.

Lorsqu'une substance a traversé la zone barrière, la couche de Malpighi ne s'oppose pas à une pénétration plus profonde. En effet MAC-KEE, SULZBERGER, HERMANN et BAER (1945) ont pu montrer que l'absorption des métaux lourds, des sulfamides et des colorants incorporés à différents excipients, s'effectuait à travers les follicules pileux. Dans certains cas, ces auteurs ont observé l'imprégnation des couches profondes de l'épiderme par voie rétrograde depuis les follicules pileux et le derme jusqu'aux couches vivantes de l'épiderme, ce qui prouve leur grande perméabilité. Pour SAGAMI (1959) la jonction dermo-épidermique pourrait se comporter comme un obstacle à l'absorption lorsque la zone de REIN est détruite.

4) Les glandes sudoripares

La peau de la paume de la main et de la plante des pieds, dépourvue de follicules pileux et très riche en glandes sudoripares, est peu perméable (ROTHMAN, 1954). Bien que, après application cutanée, le Thorium X (GRAUL, 1953) et le mercure aient été mis en évidence dans le canal excréteur des glandes, ils n'ont pas été détectés plus profondément. Le rôle des glandes sudoripares paraît, ainsi, peu important.

On reconnaît donc deux barrières à la pénétration cutanée : une barrière lipidique, présente dans les appareils pilo-sébacés et à la surface de l'épiderme, facilement traversée par les substances lipophiles et susceptible d'émulsionner lentement les solutions aqueuses, et une barrière électrostatique située entre le *stratum corneum* et la couche de Malpighi, de nature mal définie, imperméable à l'eau et aux électrolytes.

Ces constatations permettent de penser que l'absorption percutanée peut se faire selon deux modalités différentes (MALKINSON, 1960b) : d'une part pour les substances lipidiques ou liposo-

lubles, elle s'effectue par les appareils pilo-sébacés et l'épiderme suivant une intensité qui dépend de la pilosité, d'autre part pour les électrolytes, l'eau et certains métaux lourds, le passage se fait très lentement par la seule voie des appareils pilo-sébacés.

Il nous semble pourtant, bien que TREGAR (1962) considère que la pénétration des substances est un processus physique indépendant de l'activité métabolique, que la perméabilité des éléments vivants de la peau ainsi que leur affinité pour les différentes substances sont susceptibles d'intervenir. En effet STUTTGEN et BETZLER (1956 et 1957) ont mis en évidence une perméabilité sélective de la peau aux ions calcium, sulfates et phosphates. Ces auteurs ont constaté que des inhibiteurs enzymatiques : monoiodacétate et chlorure mercurique augmentent la perméabilité alors qu'un chauffage à 70° C la diminue, ces faits feraient penser à un transport actif.

III. — RELATION ENTRE LES PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES DES MOLÉCULES ET LEUR CAPACITÉ DE PÉNÉTRATION

Lorsqu'une substance chimique déposée sur la peau respecte l'intégrité de celle-ci, la pénétration percutanée est conditionnée en partie par ses propriétés physico-chimiques. Parmi ces propriétés, nous verrons que la liposolubilité joue un rôle prépondérant, mais pour expliquer le mécanisme de l'absorption, il est souvent nécessaire de tenir compte de l'hydrosolubilité, de l'ionisation, de la viscosité, de la volatilité et même de la configuration moléculaire des substances étudiées.

1. — La liposolubilité

La peau se comporte le plus souvent comme une membrane lipidique à la perméabilité de laquelle s'applique la théorie de MEYER et OVERTON. En effet de très nombreux travaux ont montré que la capacité de pénétration d'une substance est directement liée à sa liposolubilité classiquement exprimée par son coefficient de partage entre les lipides et l'eau.

Parmi les preuves les plus récentes de ces observations, VALETTE, CAVIER et SVEL (1954) ont montré que le degré d'absorption cutanée des hydrocarbures, des alcools et des esters dépend de la liposolubilité jusqu'aux termes en C_8 et C_9 au-delà desquels d'autres facteurs interviennent. De même TREHERNE (1956) a montré que la pénétration du méthanol, de l'éthanol, de l'Iodure d'éthyle, du glycérol et du glucose était fonction du coefficient de partage éther-eau de ces produits. Enfin la fixation de radicaux alcoyles sur le noyau de dérivés salicylés, qui augmente la liposolubilité, favorise

l'absorption percutanée (LOVEDAY, 1961). Des constatations identiques sont observées pour l'acide nicotinique et ses dérivés (STOUGHTON, CLENDENNING et KRUSE, 1960). Il est donc possible de dire que les substances doivent être liposolubles pour traverser les formations lipidiques de la peau, mais cette propriété nécessaire n'est pas suffisante.

2. — L'hydrosolubilité

Le fait qu'une substance, pour être absorbée par la peau, doive non seulement traverser les lipides cutanés mais également les cellules vivantes hydratées, a conduit certains auteurs à considérer l'importance de la solubilité dans l'eau. Pourtant les résultats constatés sont le plus souvent contradictoires. Dans la série des hydrocarbures, des alcools et des esters, tous plus ou moins liposolubles, la solubilité dans l'eau est un facteur défavorable à la pénétration (VALETTE, CAVIER et SAVEL, 1954 *a* et *b*). Par contre l'absorption des dérivés organophosphorés semble en étroite relation avec leur solubilité dans les lipides et dans l'eau (HADGRAFT et SOMERS, 1956, SHELMIER, 1960). Ce fait est confirmé par la comparaison de la pénétration du cyclohexane, du butanol et du propanol pour lesquels il est possible de relier l'absorption à travers l'épiderme à la liposolubilité et le passage dans les vaisseaux à l'hydrosolubilité (MEYER, KERK et MEYER, 1960), la vitesse de passage étant limitée par le facteur le moins favorable.

3. — Le degré d'ionisation

Les variations d'absorption cutanée observées pour les substances ionisables appliquées sur la peau en changeant leur ionisation ou leur pH, sont provoquées par une modification de leur liposolubilité. En effet la diminution du degré d'ionisation favorise la pénétration en abaissant la solubilité dans l'eau et en augmentant la solubilité dans les lipides. C'est ainsi que les anesthésiques non ionisés (MONASH, 1957), l'acide salicylique (STOLAR, ROSSI et BARR, 1960) et la nicotine base (TRAVELL, 1960) pénètrent plus rapidement que leurs sels respectifs.

4. — La volatilité

La volatilité joue un rôle non négligeable sur l'absorbabilité des substances à travers la peau. Les gaz et les composés volatils traversent aisément la peau par un phénomène de diffusion dont la vitesse dépend de la tension de vapeur à l'extérieur et à l'intérieur de l'épiderme, de la température et de la solubilité dans les lipides (CALVERY, DRAIZE et LAUG, 1946). La volatilité bien que favorable

à l'absorption cutanée n'est pas indispensable, car de nombreuses substances non volatiles sont susceptibles de franchir la barrière cutanée (alcaloïdes).

5. — La viscosité

L'augmentation de la viscosité diminue la vitesse de diffusion des substances à travers la peau et empêche la pénétration. C'est ainsi que la consistance des graisses et de la vaseline utilisées en dermatologie peut expliquer leur absorption très faible. Le rôle de cette constante physique a été précisé dans le cas des alcools et des esters par VALETTE, CAVIER et SAVEL (1954). Ces auteurs ont montré que l'augmentation simultanée de la liposolubilité et de la viscosité qui accompagne l'élévation du poids moléculaire explique par l'action opposée de ces deux propriétés sur l'absorption, le maximum de pénétration pour les termes à huit et neuf atomes de carbone. SOBRIN (1962) a également pu montrer que les huiles favorisent d'autant mieux la pénétration des médicaments qu'elles sont moins visqueuses. La viscosité serait en rapport avec la nature des acides gras, l'absorption est plus rapide lorsqu'il y a des acides à chaînes courtes ou des acides polyinsaturés. Il y aurait certainement lieu de tenir compte dans quelques cas de la forme, de la dimension et de la masse des molécules qui interviennent dans les propriétés pénétrantes des composés chimiques.

L'ensemble de ces facteurs qui favorisent ou empêchent la diffusion des substances à travers la peau ne suffisent pas à expliquer tous les phénomènes observés. D'une part, de nombreux composés hydrosolubles tels que les électrolytes, traversent la peau au moins en petite quantité (MALKINSON, 1956) bien que celle-ci leur soit théoriquement imperméable, d'autre part des substances physiologiquement actives de poids moléculaire élevé comme l'hirudine (PICHOTKA et MAYER, 1954), les vitamines hydrosolubles (RUBIN 1960), les héparinoïdes (WITTE et BRESSEL, 1960) sont caractérisables par leurs effets physiologiques après application cutanée. Ces faits ne doivent donc pas faire oublier le rôle des éléments vivants de la peau sur lequel nous sommes pratiquement ignorants.

IV. — FACTEURS FAVORISANT LA PERMÉABILITÉ CUTANÉE

L'absorption percutanée peut être augmentée ou diminuée par deux moyens différents. Il est possible d'agir soit sur les caractères de la peau tels que son hydratation ou son irrigation, soit sur des facteurs qui modifient les propriétés des substances pénétrantes, tels que la concentration des solutions utilisées, les variations de la

tension superficielle par les agents tensio-actifs, ou l'usage de véhicules appropriés parmi lesquels nous verrons surtout le rôle des solvants organiques. Nous allons étudier successivement ces différents moyens.

1. — Rôle de l'hydratation de la peau

Bien que la peau soit relativement imperméable à l'eau, de nombreuses observations montrent que le fait de maintenir une forte humidité au niveau de la couche cornée, par diminution de la perspiration à l'aide de bandages imperméables ou de cloches hermétiques, favorise notablement la pénétration cutanée. Ce phénomène a été observé avec le mercure (LAUG, VOS, UMBERGER et KUNZE, 1947), avec différents esters salicyliques (méthyle, éthyle et propylène glycol) pour lesquels l'absorption est d'autant plus intense que le coefficient de partage huile dans l'eau est plus faible (WURSTER et KRAMER, 1961) et pour le nicotat d'éthyle, la privine et l'histamine (CRONIN et STOUGHTON, 1962 b). L'humidité augmente donc l'absorption des substances en leur permettant d'atteindre facilement la zone barrière et il semble que cette action soit plus importante pour les composés hydrosolubles que pour les composés liposolubles. Pour SHELMIER (1958) l'une des actions du véhicule sur la vitesse d'absorption est conditionnée par sa capacité de maintenir ou non l'humidité de la peau. Cet auteur (1960) pense que l'augmentation du degré d'hydratation provoquerait un élargissement des pores et une modification des charges électriques de la couche cornée.

2. — Rôle de la circulation

Les modifications de l'irrigation sanguine sont susceptibles de changer la vitesse de transport des substances qui ont traversé l'épiderme, mais elles ne peuvent évidemment pas provoquer l'absorption d'une molécule qui ne franchit pas la barrière cutanée. Dans certains cas le taux d'absorption est augmenté par l'élévation du débit sanguin. C'est ainsi que la pénétration du tributylphosphate ^{32}P est plus rapide à travers la peau de l'animal vivant qu'à travers la peau en survie perfusée (TREGGAR, 1960); ce phénomène est attribuable aux différences entre le débit sanguin et la vitesse de perfusion. En effet la diminution du débit de la perfusion à travers la peau *in vitro* abaisse le taux d'absorption (AINSWORTH, 1960).

Les variations de débit sanguin sont obtenues soit par élévation de la température ambiante qui provoque une vaso-dilatation, (BUTCHER, 1953 a), soit le plus souvent par applications de substances vaso-actives sur la peau. Parmi celles-ci, les rubéfiants ne facilitent pas la résorption des solvants organiques et de

l'ésérine, car l'œdème qui se manifeste sous l'action de ces substances irritantes crée un courant liquide de sens opposé à celui de la traversée cutanée qui ralentit l'absorption (MEYER, KERK et MEYER, 1960). Les vaso-dilatateurs tels que l'acide nicotinique et ses esters augmentent fortement la pénétration du soufre ³⁵S (STUTTG-GEN et WUST, 1955) à travers la peau humaine, des sulfates ³⁵S à travers la peau du Lapin (LOTMAR, 1958) et des solvants chez la Souris (MEYER, KERK et MEYER, 1960).

Dans d'autres circonstances la diminution de l'irrigation cutanée ne modifie pas la pénétration. Dans ces cas, le débit sanguin reste suffisant pour entraîner toute la substance au fur et à mesure de la traversée de l'épiderme (ROTHMAN, 1954).

3. — Rôle de la concentration

L'étude du rôle de ce facteur a souvent fourni des résultats contradictoires. C'est ainsi que la vitesse d'absorption des sulfamides n'est pas modifiée pour des teneurs de 1 à 10 p. 100 dans l'excipient (STRAKOSCH et CLARK, 1943). De même la concentration du mercure dans différentes préparations n'intervient pas dans la vitesse d'absorption (LAUG, VOS, UMBERGER et KUNZE, 1947). Par contre la vitesse de passage de l'acide salicylique à travers la peau est proportionnelle à sa concentration dans un gel de méthylcellulose jusqu'à un titre de 3 p. 100 au-delà duquel il n'existe plus de relation (LOVEDAY, 1961).

Ces contradictions proviennent du fait que pour les concentrations élevées la vitesse de délivrance de la substance entre le véhicule et l'épiderme est supérieure à la capacité de transport du sang, ce qui limite la pénétration (SHELMIRE, 1960).

4. — Action des agents tensio-actifs

Le rôle des agents tensio-actifs a été remarqué dès 1945 par MAC-KEE, SULZBERGER, HERMANN et BAER. Ces auteurs ont montré que le mélange d'un alkyl-benzène-sulfonate de sodium, de propylène glycol et d'antipyrine favorise de façon remarquable la pénétration des substances qui y sont dissoutes. De même le mercure dans un excipient contenant un mouillant (LAUG, VOS, UMBERGER et KUNZE, 1947), le salicylate de diéthylamine en présence d'un tensio-actif non ionique (BLANPIN et BRETAUDEAU, 1961), le salicylate de sodium, l'oléate de potassium et le glucose dans des mélanges contenant du savon (BETLEY, 1961) traversent plus rapidement la peau qu'avec des véhicules dépourvus de mouillants. Par contre l'absorption de l'acide salicylique est inhibée par l'addition d'agents tensio-actifs à groupe polyoxyéthylène par suite

d'une combinaison chimique entre les deux substances (STOLAR, ROSSI et BARR, 1960, LOVEDAY, 1961).

De nombreuses expériences semblent montrer que l'action favorisante des mouillants sur la pénétration est souvent le résultat d'une irritation qui s'accompagne d'une destruction de la barrière cutanée (BETTLEY et DONOGHUE, 1960, VINSON et CHOMAN, 1960). En effet l'étude de la pénétration de l'eau en présence de sulfates d'alcoyles et des savons dont la chaîne carbonée est constituée de 8 à 18 atomes de carbone (SZAKALL et SCHULZ, 1960) a permis de relier l'intensité de la résorption hydrique à l'action irritante de ces substances. L'effet se montre maximum pour les molécules à 12 atomes de carbone.

Ces constatations récentes confirment que les détergents modifient la souplesse de la kératine (BLANK et SHAPPIRO, 1955), sans doute à la suite d'une altération de la structure moléculaire de cette scléroprotéine (VAN SCOTT et LYON, 1953).

Les agents tensio-actifs les moins irritants font partie des savons ou des détergents non ioniques (VINSON et CHOMAN, 1960, LESSHAFT, 1960, BETTLEY, 1961).

L'action des agents tensio-actifs ne s'accompagne en général d'aucune pénétration dans le milieu intérieur, l'emploi de molécules marquées a mis ce fait en évidence. C'est ainsi que les alcoyl-sulfates de sodium, (lauryl-sulfate et dodecyl-sulfate) les alcoyl-benzène-sulfonates de sodium marqués au soufre 35 sont fixés dans la couche cornée sans pénétration profonde (CHOMAN, 1960, BLANK et GOULD, 1959, 1961 *a*). Par contre il y a une légère pénétration du laurate de sodium dans l'épiderme et le derme, surtout aux pH alcalins (BLANK et GOULD 1961 *b*).

Les agents tensio-actifs auraient donc une action parfois irritante limitée à la surface de la peau ; ils abaissent la tension superficielle des excipients auxquels ils sont incorporés, ce qui permet, d'une part, de préparer des véhicules très pénétrants constitués par une phase aqueuse et lipidique intimement mélangées et, d'autre part, d'augmenter la surface de contact entre la peau et la substance active. Ces différents mécanismes favorisent fortement l'absorption percutanée.

5. — Rôle du véhicule

Les recherches de nouveaux excipients pour pommades ont fait l'objet de nombreux travaux concernant le rôle et l'effet des véhicules sur la peau. Les résultats passés en revue par SOBRIN (1962) font ressortir les conclusions de VALETTE (1954) qui pense que le choix judicieux d'un véhicule permet de modifier la pénétration de la substance qui lui est incorporée, mais si celui-ci peut diminuer ou accélérer l'absorption, il ne peut en aucun cas entraîner la pénétration d'une substance non pénétrante.

Les solvants organiques sont au nombre des composés doués d'un pouvoir de pénétration élevé par suite de leur grande liposolubilité, que nous avons vu être le facteur prépondérant de l'absorption percutanée. PARISOT (1863) a été l'un des premiers à prouver que l'éther et le chloroforme aidaient la traversée rapide de l'épiderme ; en effet des solutions d'atropine dans ces solvants appliquées sur la peau de l'homme provoquent la dilatation de la pupille en quelques minutes, l'action de l'alcool est plus faible car les effets ne se manifestent qu'après une demi-heure.

Depuis différents essais mettant à profit les effets pharmacologiques de substances actives incorporées aux solvants ont permis de prouver indirectement l'absorption percutanée des solvants déposés sur la peau.

Les alcaloïdes et les hétérosides ont été les plus utilisés. Parmi ceux-ci, la strychnine en solution chloroformique traverse la peau et provoque la mort d'un lapin en dix minutes (WINTERNITZ, 1891). Les hétérosides cardiotoniques manifestent leur action toxique à travers la peau du cobaye lorsqu'ils sont en solution dans les hydrocarbures aliphatiques, aromatiques ou chlorés (MEYER, 1959).

VALETTE et CAVIER (1950, 1951 et 1954) ont utilisé les effets de l'ésérine sur le muscle strié du Rat et montré le rôle favorable des hydrocarbures, des alcools, des esters éthyliques et des acétates d'alcoyles dans la pénétration de cet alcaloïde. Le maximum d'action a été constaté pour les carbures benzéniques et pour les composés possédant six à huit atomes de carbone. MEYER et ses collaborateurs ont repris le même test appliqué à la Souris et confirmé les résultats précédents avec les hydrocarbures et leurs dérivés halogénés, les aldéhydes aliphatiques, les carbures insaturés, les acétates d'alcoyles le cyclohexane (MEYER, KERK et MEYER, 1959, MEYER et KERK, 1959) et enfin le benzène et ses homologues (MEYER et KERK, 1960). Les conclusions de HUERRE (1961) sont identiques pour les hydrocarbures bromés.

Ces différentes méthodes d'estimation de l'absorption percutanée des solvants sont indirectes. En effet, bien que LAZAREW, BRUSILOWSKAJA, LAWROW et LIPSCHITZ (1931) aient mesuré de manière directe mais incomplète la pénétration percutanée du benzène par analyse de l'air expiré et que VALETTE, CAVIER, TRUHAUT et RUCARD (1956) aient déterminé le taux de passage des solvants chlorés par mesure de leurs effets toxiques, on peut se demander dans les autres cas si les deux composants traversent la peau au même rythme ou si le véhicule précède le composé actif et lui prépare le passage.

Cette dernière hypothèse serait confirmée par les expériences qui consistent à délipider la peau par les solvants avant l'application d'une substance. Ce traitement préliminaire augmente la pénétration de l'eau (MALI, 1956) de l'iodure de sodium ¹³¹I dans divers excipients (KUTZIM, 1957) et de l'acide salicylique en solution aqueuse (LOVEDAY, 1961). Pourtant MEYER, KERK et MEYER (1960)

n'ont pas constaté cet effet favorable du cyclohexane sur la pénétration de l'ésérine en solution dans le propylène glycol.

L'étude des voies d'absorption à travers l'épiderme n'explique pas davantage le rôle des solvants dans la pénétration cutanée, en effet les méthodes employées sont encore indirectes. A l'aide de vert malachite dissous dans le chloroforme, dans le dichloroéthane le dichlorométhane (JOACHIMOGLU, 1921) ou le tétrachloréthane (VALETTE, CAVIER, THUHAUT et RUCARD, 1956), il a été montré que le colorant se concentre dans les couches cornées, puis dans l'appareil pilo-sébacé sans aller au-delà du niveau ou débouche le canal excréteur des glandes sébacées. La couche de Malpighi et le derme ne sont pas atteints (VALETTE, CAVIER, THUHAUT et RUCARD, 1956).

Il n'est pas prouvé que le véhicule et le corps dissous restent associés au cours de la pénétration, il semble même que ce ne soit pas le cas, car le vert malachite et la rhodamine B en solution dans le cyclohexane se comportent différemment dans la peau (MEYER, 1962). Une absorption du premier colorant est décelée alors que le second ne pénètre pas. Cette observation prouve dans ce cas, qu'il y a une migration séparée du solvant et des traceurs à travers la peau. VALETTE a pu constater que les hydrocarbures benzéniques et surtout le *p*-cymène sont les corps qui favorisent le plus la pénétration. En effet l'incorporation de *p*-cymène à différents excipients augmente fortement la vitesse d'absorption des substances qui y sont dissoutes, corticostéroïdes, testostérone ou cardiazol (VALETTE et HUERRE, 1957, VALETTE, HUERRE et ZIZINE, 1958). Ces différents résultats justifient donc une étude plus approfondie de la pénétration du *p*-cymène à travers la peau.

* * *

En résumé, on admet à l'heure actuelle que la peau se comporte comme deux barrières, l'une, peu efficace formée par les lipides qui imprègnent la kératine et les formations pilo-sébacées, l'autre, de nature électrostatique, imperméable aux solutions d'électrolytes et située entre les cellules vivantes et les cellules mortes de l'épiderme.

L'absorption percutanée se fait à la fois à travers l'épiderme et à travers les appareils pilo-sébacés, l'élection de l'une de ces voies dépend des propriétés physico-chimiques de la substance déposée sur la peau. Au nombre de ces propriétés la liposolubilité est le facteur le plus important. Il faut noter que le rôle des éléments vivants de la peau et celui de la résorption sanguine sont des facteurs dont l'importance est peu connue. La vitesse d'absorption peut être modifiée en perturbant l'état physiologique de la peau (hydratation et irrigation) ou en changeant les propriétés des substances (variation de concentration, addition d'agents tensio-actifs ou d'adjuvants de pénétration). Parmi ces adjuvants le *p*-cymène favorise l'absorption de nombreux composés ; il nou-

a semblé intéressant d'étudier d'une façon plus précise ce solvant liposoluble après l'avoir marqué au carbone 14. Nous avons essayé à l'aide de cette molécule de déterminer son rôle dans l'absorption des substances et de rechercher les mécanismes physiologiques qui permettent la pénétration des composés lipophiles.

CHAPITRE II

RAPPEL DES TECHNIQUES DE LA RADIOACTIVITÉ APPLIQUÉE A L'ÉTUDE DE LA PERMÉABILITÉ CUTANÉE

Il ressort de la mise au point de MALKINSON (1956), que les premiers résultats obtenus à l'aide des radio-isotopes dans l'étude de la pénétration cutanée, ont permis de prouver l'absorption par la peau de l'eau tritiée (PINSON, 1952, DELONG, THOMPSON et KORNBERG, 1954) et de suivre la pénétration d'ions minéraux incorporés comme traceurs à différents véhicules. Depuis, l'emploi des radioéléments s'est généralisé et l'étude du passage de substances organiques difficiles à doser a pu être abordée grâce au marquage de ces composés.

Les méthodes et dispositifs expérimentaux passés en revue par VALETTE (1954), GEMMEL et MORRISON (1957), AINSWORTH (1960), et BLANK (1960 *b*) sont applicables à l'étude par les radio-isotopes de la perméabilité cutanée.

Les techniques de détection des molécules marquées font plus particulièrement appel à la localisation histologique par autordiagraphie et à la mesure de la radioactivité effectuée à la surface de la peau, dans l'organisme ou les excréta.

I. — MODE DE MARQUAGE DES SUBSTANCES

Les radioéléments sont utilisés comme traceurs par mélange avec la substance étudiée, ou intégrés par synthèse dans la molécule. Ils ont le caractère d'un atome étranger ou constitutif, suivant qu'ils ont été introduits par addition ou substitution dans la molécule originelle.

1. — Utilisation des radioéléments comme traceurs

Les radioéléments minéraux ont été incorporés à différentes substances, le plus souvent des excipients pour pommades, dont

on voulait suivre le sort à travers la peau. C'est ainsi que le chlorure de sodium ^{24}Na (JOHNTSON et LEE, 1943), l'iodure de sodium ^{131}I (KUTZIM, 1957, PLEIN et PLEIN, 1957, VON KENNEL et KUTZIM, 1959, RUGGIERO et SKAUEN, 1962), le chlorure mercurique ^{203}Hg (WERNSDORFER, 1955), le chlorure de mercuri-amine ^{203}Hg (SORBY et PLEIN, 1959) et le thorium X, ^{224}Ra , (WITTEN, ROSS, OSHRY et HOLSTROM, 1953) ont été utilisés de cette manière. L'interprétation des résultats obtenus comporte un élément d'incertitude, car s'il est possible de suivre le traceur, il est aléatoire de conclure à un sort identique du véhicule, néanmoins ces expériences ont mis en évidence la pénétration de faibles quantités d'ions minéraux à travers la peau.

La diiodofluorescéine ^{131}I (HADGRAFT, SOMERS et WILLIAMS, 1956) a également été employée pour tester l'absorption des pommades.

2. — Incorporation d'iode radioactif dans la molécule

Seule la pénétration cutanée de l'acide stéarique marqué à l'iode 131 (BUTCHER, 1953 b) a été étudiée de cette manière, en effet, la méthode est critiquable, car la molécule modifiée possède des propriétés pénétrantes différentes de l'huile originelle et au cours de l'absorption, il peut se produire une désiodation de la substance comme cela a été observé avec l'acide oléique ^{131}I pendant l'absorption intestinale (GRENIER, HATANO et WEISS, 1961). Ces raisons ont amené les chercheurs à utiliser de plus en plus des molécules dans lesquelles sont incorporées des atomes radioactifs constitutifs de celles-ci.

3. — Synthèse des molécules marquées

Les atomes radioactifs employés sont le carbone ^{14}C , le phosphore ^{32}P , le soufre ^{35}S et plus récemment le tritium qu'il est possible d'utiliser facilement pour marquer de très nombreuses molécules par la méthode d'échange de WILZBACH (1957).

Nous avons réuni dans le tableau I, à titre d'exemples un certain nombre de composés dont on a étudié la pénétration cutanée. L'emploi de ces molécules nécessite de nombreuses précautions pour éviter certaines causes d'erreurs dues à l'instabilité des composés radioactifs qui, par radiolyse peuvent être dénaturés. C'est ainsi que le Sarin ^{32}P (méthyl isopropyl fluoro phosphate) subit une décomposition au cours de son passage à travers la peau (BLANK, GRIESEMER et GOULD, 1957) et que des corticostéroïdes tels que la 6-méthylprednisolone et l'acétonide de la triamcinolone marquées sur une chaîne latérale sont instables et ne permettent pas une étude valable de l'absorption (MALKINSON, 1960 a).

TABLEAU I. — *Principales molécules marquées utilisées dans l'étude de l'absorption percutanée*

Molécules marquées au carbone 14.

Méthanol, Ethanol, Iodure d'éthyle, Urée, Glycérol, Glucose	TREHERNE 1956.
Hydrocortisone	SCOTT et KALZ 1956. MALKINSON 1958.
Cortisone	MALKINSON, FERGUSON et WANG 1957.
Testostérone	MALKINSON 1958.
Diéthylditoluamide	SCHMIDT, ACREE et BOWMAN 1959.
Laurate de sodium	BLANK et GOULD 1959 et 1961 <i>b</i> .
Progestérone	GOLDZIEHER et BAKER 1960.

Molécules marquées au soufre 35.

Ypérite	AXELROD et HAMILTON 1947.
Méthionine	EDWARDS 1954.
Thiourée	TREHERNE 1956.
Dodecyl sulfate de sodium	BLANK et GOULD 1959.
Lauryl sulfate de sodium	CHOMAN 1960.
Alcoyl benzène sulfonate	BLANK et GOULD 1961 <i>a</i> .
Diéthylidithiolisophtalate	ELLARD, GARROD, SCALES et SNOW 1963.

Molécules marquées au phosphore 32.

Isopropyl méthyl fluoro phosphate (Sarin)	BLANK, GRIESEMER et GOULD 1957 et 1958, MAC-PHAIL et ADIE 1960.
Tributyl phosphate	AINSWORTH 1960, TREGGAR 1960 et 1961.
Tripropyl phosphate	MARZULLI et TREGGAR 1961.

Molécules marquées à l'arsenic.

Lewisite	AXELROD et HAMILTON 1947.
----------------	---------------------------

Molécules marquées au chlore 36.

Griséofulvine	SCOTT 1960.
---------------------	-------------

Molécules marquées au tritium.

Vitamine A	STUTTGEN et KRAUSE 1959.
Panthénol	STUTTGEN et KRAUSE 1960.
Estradiol 17 β	GOLDZIEHER et BAKER 1960.

Il convient donc dans la mesure du possible d'introduire le radionucléide à l'intérieur du cycle ou sur un groupement de la molécule qui ne subit pas de dégradation au cours du métabolisme. Il est en outre nécessaire d'identifier la nature des composés dont on mesure la radioactivité après la pénétration. Si la traversée cutanée aboutit à une modification de la substance essayée, cette transformation doit être identique à celle qui est observée avec le même produit inactif, utilisé dans les mêmes conditions.

II. — TECHNIQUES DE DÉTECTION

Les méthodes qualitatives et quantitatives sont en général employées conjointement pour apprécier les différents aspects du phénomène étudié.

1. — Technique qualitative : l'autoradiographie

L'autoradiographie permet de compléter les procédés histo-chimiques de détection des substances dans la peau, surtout pour les molécules peu réactives chimiquement, telles que les hydrocarbures. Cette méthode convient particulièrement pour les radio-éléments dont l'énergie de rayonnement est faible (Tritium, Carbone, Soufre), mais les résultats obtenus avec des radioéléments dont les émissions sont plus énergiques, Phosphore 32 (BLANK, GRIESEMER et GOULD, 1957), Iode 131 (BUTCHER, 1953 *b*) sont moins précis, car ils donnent un phénomène de halo sur l'émulsion photographique qui rend toute localisation précise difficile.

Dans le cas le plus général, la peau est débitée en coupes radiales, bien que pour éviter les souillures par le rasoir des couches inférieures de l'épiderme par un excès de substance à la surface de la peau, CHOMAN (1960) préconise de préparer des coupes parallèles à la surface cutanée en commençant par les couches profondes.

Les autoradiographies obtenues permettent de localiser la radioactivité. Il convient de vérifier l'absence d'effets pseudoradiographiques par action photochimique (les substances réductrices présentes dans les tissus peuvent donner lieu à des réactions chimiques avec l'émulsion photographique, qui noircit en des points où il n'existe pas de radioactivité), ou par pression de la coupe sur le film. Par exemple, les poils peuvent dans certains cas impressionner l'émulsion photographique en l'absence de toute radioactivité (BLANK, 1960 *b*).

Dans l'interprétation des résultats, il faut se souvenir qu'un autoradiogramme indique uniquement la position du radioélément dans les structures de la peau et ne montre pas nécessairement le chemin suivi par le radionucléide. Pour préciser ce dernier il faut effectuer une série d'essais échelonnés dans le temps.

2. — Techniques de dosage

a) MESURE IN VIVO DE LA DISPARITION DE LA RADIOACTIVITÉ DÉPOSÉE A LA SURFACE DE LA PEAU

Lorsque la substance radioactive n'est pas volatile, il est possible de mesurer la pénétration cutanée à l'aide d'un appareil

de mesure placé au-dessus de la zone imprégnée du radioélément. La diminution de la radioactivité à ce niveau permet de connaître la quantité de substance qui a pénétré. C'est ainsi que la disparition de la testostérone ^{14}C et de l'hydrocortisone ^{14}C appliquées sur la peau de l'avant-bras a pu être appréciée par comptage externe (MALKINSON, 1958). Le même procédé a été utilisé pour mesurer la résorption de l'Iodure de sodium ^{131}I appliqué sur la peau du Rat (VON KENNEL et KUTZIM, 1959) et du Tributyl phosphate ^{32}P déposé sur la peau du porc (TRÉGEAR, 1961, AINSWORTH, 1960). Cette méthode a l'avantage de ne nécessiter qu'une faible quantité de substance radioactive, car la radioactivité résiduelle reste assez importante pour permettre une détection facile, mais il est parfois délicat d'apprécier une faible pénétration et de différencier une simple adsorption dans les couches cornées d'une véritable pénétration.

b) MESURE IN VITRO DE L'APPARITION DU COMPOSÉ MARQUÉ APRÈS SA TRAVERSÉE DE LA PEAU

Lorsque la pénétration est étudiée sur la peau isolée, il est possible de disposer un appareil de détection à la face interne de la peau et de mesurer l'apparition de la radioactivité dans le liquide de survie. La peau peut être placée simplement sur un récipient rempli de solution physiologique dont le fond constitué par un compteur de GEIGER permet d'en déterminer la radioactivité (TREHERNE, 1956). Mais ce procédé est limité aux radioéléments de faibles énergies pour éviter de détecter la radioactivité restée à la surface de la peau ; de plus les résultats obtenus sont critiquables car le non renouvellement du liquide de survie peut modifier l'absorption.

Pour éviter ces inconvénients d'autres méthodes plus délicates à mettre en œuvre assurent l'irrigation de la face inférieure de la peau ou même la perfusion de celle-ci (AINS WORTH, 1960). Dans ce cas, on se rapproche davantage des conditions physiologiques. Ces techniques ont l'avantage de fournir des résultats reproductibles, mais elles restent assez éloignées des conditions rencontrées chez les animaux vivants auxquels il est préférable de s'adresser.

c) DOSAGE DE LA RADIOACTIVITÉ DANS LES TISSUS APRÈS PÉNÉTRATION A TRAVERS LA PEAU IN VIVO

La quantité de substance qui pénètre à travers la peau peut être déterminée par analyse des tissus, mais comme il est difficile d'effectuer les mesures sur l'animal entier, sauf pour les petits animaux (AINS WORTH, 1960), on se contente le plus souvent de doser la radioactivité dans le sang, dans un organe qui présente une affinité particulière pour le composé étudié, ou dans les excréta.

La valeur de la concentration de la substance dans ces différents échantillons ne rend pas compte de la pénétration totale, car la distribution ou l'excrétion de la molécule n'est pas uniforme et résulte d'un équilibre dynamique qui varie à chaque instant. Pourtant les mesures peuvent être rendues quantitatives dans le cas particulier où l'élimination s'effectue en totalité par une seule voie sans accumulation dans l'organisme.

L'usage d'animaux dits « calibrés » par GRIESEMER, BLANK et GOULD (1958), permet également par simple détermination de la concentration sanguine d'apprécier l'absorption globale. La méthode consiste à administrer par voie intraveineuse lente la substance que l'on désire étudier, puis à la doser dans le sang à différents intervalles de temps. La construction de la courbe qui met en relation la quantité injectée et la concentration dans le sang rend possible, à partir de cette même mesure, l'estimation ultérieure de l'absorption de la substance lorsqu'elle est appliquée sur la peau.

La détermination de la radioactivité dans le liquide circulant a permis aussi d'analyser la pénétration de la diiodofluoresceïne ^{131}I (HADGRAFT, SOMERS et WILLIAMS, 1956) et de l'hydrogène sulfuré ^{35}S (DOERING et BARTELHEIMER, 1960). Le dosage des composés marqués dans la peau après application de tétra et de pentathionate ^{35}S (NEESBY, PIRCIO et GRATTAN, 1957) empêche de distinguer entre la pénétration et l'adsorption dans les couches superficielles de la peau. Par contre la profondeur de l'absorption peut être mesurée en dosant le radioélément dans les couches cutanées séparées par des artifices divers tels que ceux décrits par SZAKALL (1951) et TSANEY (1960) : macération de la peau, traitement par l'acide acétique dilué, ou l'acide citrique, coupes au microtome, arrachage des assises à l'aide d'un ruban adhésif, digestion trypsique. C'est ainsi que BLANK et GOULD (1959) ont déterminé la profondeur de pénétration de mouillants et que STUTTGEN et KRAUSE (1959 et 1960) ont pu montrer l'absorption de la vitamine A et du Panthénol tritié dans les couches profondes de la peau, séparées en pratiquant des coupes au microtome à congélation.

L'affinité de l'Iode pour la thyroïde (SKAUEN, CYR, CHRISTIAN et LEE, 1949 ; CYR, SKAUEN, CHRISTIAN et LEE, 1949 ; TAS et FEIGE, 1958 ; RUGGIERO et SKAUEN, 1962), celle du mercure pour le foie et les reins (WERNSDORFER, 1955 ; SORBY et PLEIN, 1959) ont été mises à profit pour évaluer l'absorption de ces substances en les dosant dans ces différents organes.

La facilité avec laquelle il est possible de détecter la radioactivité dans l'urine a permis de mesurer l'absorption du chlorure de sodium ^{24}Na (JOHNSTON et LEE, 1943), des sulfures et du soufre marqués au soufre 35 (STUTTGEN et WUST, 1955, DOERING et BARTELHEIMER, 1960), de l'eau tritiée (PINSON, 1952), de la cortisone ^{14}C et des hormones œstrogènes ^{14}C ou tritiées (MALKINSON, FERGUSON et WANG, 1957, GOLDZIEHER et BAKER, 1960).

Lorsque l'élimination emprunte d'autres émonctoires, il est nécessaire de doser la substance à la fois dans l'urine et les matières fécales. Tel est le cas du diéthyltoluamide appliqué sur la peau de cobaye (SCHMIDT, ACREE et BOWMAN, 1959). Pour les substances volatiles qui passent en partie par voie pulmonaire, il faut compléter ces déterminations par la mesure de la radioactivité dans l'air expiré. C'est ainsi qu'a été appréciée la vitesse d'absorption du Radon (LANGE et EVANS, 1917) et d'un composé antilépreux (Diéthylthiolisophthalate) par ailleurs dosé dans l'urine et les matières fécales (ELLARD, GARROD, SCALES et SNOW, 1963).

* * *

L'utilisation des isotopes radioactifs tend à se généraliser dans l'étude de la pénétration cutanée. L'emploi de molécules, dans lesquelles sont incorporés par synthèse les radioéléments, est à préférer aux méthodes qui utilisent les radionucléides en mélange avec la substance étudiée. Il est nécessaire de mettre en œuvre le plus grand nombre de techniques afin d'arriver dans la mesure du possible à déterminer le parcours suivi par la molécule et à apprécier le taux de pénétration, qu'il convient d'exprimer en quantité par unité de surface et de temps.

Les résultats obtenus doivent être soigneusement analysés et vérifiés pour se mettre à l'abri d'interprétations erronées ayant pour origine une radiolyse de la molécule marquée.

Nous avons, dans le travail qui suit, essayé de mettre en pratique ces quelques conclusions.

CHAPITRE III

DESCRIPTION DES MÉTHODES PERSONNELLES D'ÉTUDE

Nous avons été amenés à mettre au point différents appareillages que nous décrirons au fur et à mesure de leur utilisation dans les chapitres suivants et à adapter les méthodes de détection et de dosage du carbone 14 pour une substance marquée volatile.

Les techniques utilisées sont de deux sortes, les unes qualitatives font appel aux méthodes d'autoradiographie, les autres quantitatives nécessitent un traitement préalable des échantillons biologiques soumis à la mesure de compteurs étalonnés. L'autoradiographie a été dans tous les cas utilisée ; des mesures quantitatives ont été faites lorsqu'elles étaient possibles et que les résultats qualitatifs se révélaient particulièrement intéressants.

I. — AUTORADIOGRAPHIE DE SUBSTANCES MARQUÉES VOLATILES (1)

Dans le but d'étudier la pénétration et la localisation du *p*-cymène introduit par différentes voies chez plusieurs espèces animales et de mettre en évidence l'hydrocarbure aussi bien à l'échelle de l'animal entier qu'à l'échelle histologique sur des prélèvements de tissus, nous avons été amenés à résoudre les problèmes suivants :

- 1° Eviter l'évaporation de la molécule marquée volatile.
- 2° Conserver un document biologique susceptible d'être examiné au microscope.
- 3° Utiliser des doses non toxiques de substance marquée, même d'activité spécifique faible.
- 4° Différencier la molécule de *p*-cymène de ses produits de dégradation.

(1) Cette méthode a été présentée au premier symposium Européen d'autoradiographie dans les Sciences Médicales, Rome, juin 1961, en collaboration avec Yves COHEN.

Parmi les nombreuses techniques d'autoradiographie dont les principales sont décrites par BOYD (1955), aucune ne permet l'étude histologique facile de la répartition d'un composé volatil. Nous avons adapté à notre étude la méthode de ULLBERG (1954), modifiée par COHEN et DELASSUE (1959) et la méthode de PELLERIN (1957).

Rappelons le principe de la méthode de ULLBERG : les animaux qui ont reçu la substance radioactive sont tués par immersion dans l'acétone refroidie à -78°C par la neige carbonique. Dans une chambre froide à -10°C les corps congelés sont montés sur une platine de microtome à glissières. Collées sur un ruban adhésif d'acétate de cellulose, des sections de $20\text{ }\mu$ d'épaisseur sont détachées. Ces coupes sont desséchées dans la chambre froide elle-même, puis appliquées sur un film radiographique. COHEN et DELASSUE ont modifié cette technique en supprimant la chambre froide et en utilisant un microtome à congélation installé dans un laboratoire ordinaire.

Suivant la méthode de PELLERIN, les sujets congelés dans l'azote liquide à -195°C acquièrent la dureté d'un métal léger, ce qui permet de préparer un plan d'autoradiographie par fraisage de l'animal sur une machine-outil. L'exposition autoradiographique est effectuée dans la vapeur saturante de l'azote liquide, contenu dans un récipient de mousse de téflon, ce qui maintient une température comprise entre -120°C et -190°C .

La technique de ULLBERG offre la possibilité de conserver le document biologique lui-même comme terme de référence, mais elle n'est pas applicable aux substances qui présentent une tension de vapeur à -10°C .

La technique de PELLERIN évite le temps de dessiccation à -10°C , ce qui présente l'avantage majeur d'empêcher toute perte de molécules volatiles ; cependant, elle permet difficilement la comparaison de l'autoradiographie avec le document biologique.

Nous avons tiré parti de l'une et de l'autre méthode en opérant comme suit : les animaux ou le tissu prélevé *in vivo* sont plongés dans l'azote liquide à -195°C , puis débités au microtome à congélation lorsque leur température est revenue progressivement à -10°C . La section au microtome détache des coupes de $20\text{ }\mu$ collées sur ruban d'acétate de cellulose et prépare un plan d'application du film radiographique sur le bloc.

La dernière coupe, desséchée à -20°C , constitue le document biologique de référence. En effet, les structures histologiques de sa face inférieure s'apparient aux structures histologiques de la surface du bloc (fig. 1b). Un film appliqué sur celle-ci, à -30°C , est impressionné par la molécule marquée volatile et éventuellement par ses produits de dégradation non volatils. Le film apposé à -20°C sur la coupe desséchée permet de localiser les produits de dégradation non volatils.

La comparaison, à l'œil nu ou au microscope, de la coupe avec les deux films, localise exactement la molécule et ses métabolites.

Technique

1) CONGÉLATION. — Les préparations biologiques, animal entier ou organe, sont, après administration de la substance radioactive, congelées par immersion dans l'azote liquide à -195°C , puis, conservées pendant 48 heures dans un réfrigérateur à -20°C .

2) PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON. — Après ce délai, la préparation congelée est sortie du réfrigérateur. Dans le cas de la Souris entière, les deux flancs de l'animal sont éliminés au couteau de façon que les sections passent à l'extérieur des reins (fig. 1a). L'objet est fixé sur la platine du microtome à congélation.

Nous opérons différemment pour préparer la coupe et le bloc :

Coupes. — On égalise la surface du bloc avec un scalpel et on effectue des coupes de $20\ \mu$. Sur la section fraîche du bloc, on dépose une goutte d'éther de pétrole pour éviter la formation du givre et on colle rapidement un ruban adhésif d'acétate de cellulose (Scotch-tape). On détache la coupe avec le couteau refroidi par un jet de gaz carbonique. La coupe collée sur le ruban est transportée en moins de 15 secondes dans un réfrigérateur à -20°C où elle se dessèche en trois jours environ, par sublimation au froid de l'eau qu'elle contient.

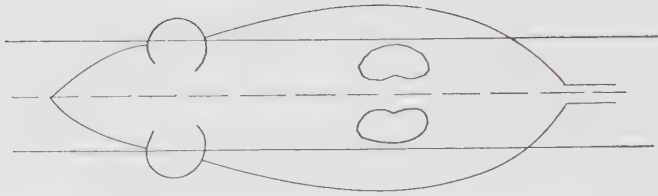
Bloc. — La dernière coupe pratiquée, la surface de l'échantillon est recouverte de ruban adhésif. Le bloc refroidi par détente de gaz carbonique est décollé de la platine au moyen d'un scalpel, puis mis au contact de neige carbonique pendant 15 minutes afin de l'amener à la température de -78°C .

3) APPLICATION SUR LE FILM RADIOGRAPHIQUE. — Le film radiographique est appliqué de façon différente pour les coupes et le bloc.

Coupes. — La coupe de référence desséchée est mise au contact du film (Kodirex monocouche) durant 8 à 15 jours à -30°C . Le film est ensuite révélé suivant les techniques classiques.

Bloc. — En chambre noire, le ruban adhésif retiré, le bloc est rapidement appliqué sur un rectangle de film (Kodirex monocouche ou Dentus rapid) de 5 cm sur 8 cm, à l'aide d'une presse également refroidie à -78°C . Celle-ci est constituée par une plaque de matériau de grande inertie thermique qui présente une dépression de la taille du film, comme on peut le voir sur la figure 1 c. Le bloc est assujéti par des tendeurs de caoutchouc. La presse est placée sur des cubes de neige carbonique dans une boîte obscure et transportée au réfrigérateur pendant 15 jours à -30°C (fig. 1 c). Le film est alors révélé comme précédemment.

a



b

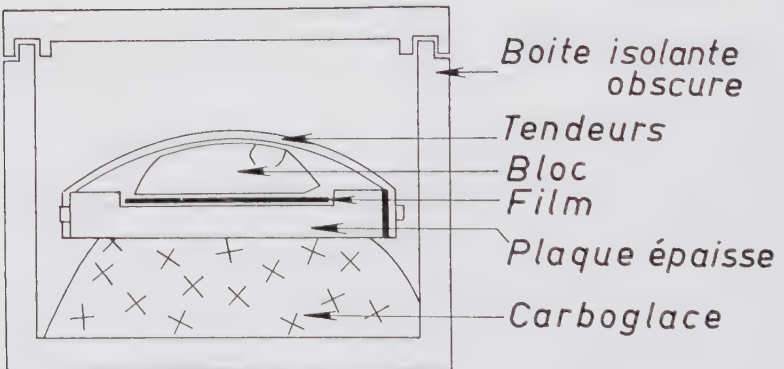
*Coupe de
référence*



Bloc

Platine

c



*Boîte isolante
obscure*

Tendeurs

Bloc

Film

Plaque épaisse

Carboglace

FIG. 1. — Méthode d'autoradiographie.

a) Schéma de la préparation de l'objet, élimination des portions latérales.

b) Schéma de la séparation de la coupe de référence collée sur un ruban adhésif d'acétate de cellulose et du bloc fixé sur la platine du microtome.

c) Exposition du film radiographique sur le bloc ; transport dans une boîte obscure contenant de la neige carbonique.

Discussion

Dans les conditions précisées ci-dessus, nous avons vérifié l'absence d'effets pseudoradiographiques par action photochimique ou diffusion de la molécule volatile.

Les effets photochimiques ont été recherchés en effectuant des essais avec des blocs et des coupes dépourvues de radioactivité. Les résultats montrent l'absence d'impression sur les films. Néanmoins, il faut remarquer, que dans le cas des blocs, il est indispensable de maintenir le contact sur le film à une température de -30°C pour éviter des effets pseudoradiographiques au niveau de la vessie. De plus, l'interposition d'une feuille de papier de cellophane entre le bloc radioactif et le film montre que les images obtenues sont identiques à celles qui sont réalisées sans écran à l'intensité près. On peut donc conclure que l'exposition d'un tissu congelé à -30°C sur une émulsion photographique ne fait pas apparaître d'artefacts.

Les limites précises des images autoradiographiques montrent que la diffusion, que l'on pouvait craindre à juste titre à -30°C , ne paraît pas décelable par notre méthode.

L'impression des films par les blocs congelés est plus faible que par les coupes desséchées, en effet, la présence d'eau diminue la concentration radioactive des échantillons biologiques et augmente l'auto-absorption. Néanmoins, la quantité de carbone 14 nécessaire pour obtenir de bons clichés est d'environ $1\ \mu\text{Ci}$ pour une Souris de 20 g.

La comparaison de l'autoradiographie du bloc et de celle de la coupe desséchée avec la coupe biologique de référence permet de distinguer les molécules marquées volatiles ou non. En effet, le film sensible appliqué sur le bloc est impressionné par le carbone 14 volatil et non volatil, alors que le film placé contre la coupe n'est noirci que par la radioactivité fixe.

* * *

En conclusion, cette méthode nous a permis l'étude facile de la localisation du *p*-cymène et de ses métabolites administrés par diverses voies, aussi bien à l'échelle de l'animal entier qu'à l'échelle histologique.

II. — MINÉRALISATION DES COMPOSÉS ORGANIQUES SELON LA TECHNIQUE DE VAN SLYKE ET FOLCH

De nombreuses méthodes permettant le dosage du carbone 14 après minéralisation, ont été décrites par CALVIN, HEIDELBERGER, REID, TOLBERT et YANKWICH (1949 et 1960), ARONOFF (1956), et

BUSELLU, D'AGOSTINO et ROSSI, (1959). Ces techniques sont apparentées à celles qui sont utilisées en chimie analytique pour la détermination du carbone dans les composés organiques.

Aux méthodes de minéralisation par voie sèche d'une mise en œuvre délicate et aux procédés par voie humide, tels que la minéralisation persulfurique (OSBURN et WERKMAN, 1932, ANTONY et LONG, 1952, WALKER et LOUGHEED, 1962), chromique (APELGOT et MARS, 1953) ou perchlorique d'un emploi limité, nous avons préféré la technique de VAN SLYKE et FOLCH simple et générale que nous avons adaptée à l'étude du *p*-cymène.

A) Principe

L'oxydation des composés organiques est réalisée à chaud par un mélange d'anhydride chromique et d'iodate en solution dans de l'acide sulfurique. Le gaz carbonique dégagé est recueilli par barbotage dans une solution diluée d'hydroxyde de sodium. La précipitation à l'état de carbonate de baryum permet de préparer des échantillons pour une mesure de la radioactivité.

B) Réactifs

Nous avons emprunté à VAN SLYKE et FOLCH (1940) la composition du mélange oxydant suivant .

Réactif I : (mélange de VAN SLYKE liquide)

Acide sulfurique à 20 % de SO^3	67 ml
Acide phosphorique ($D = 1,71$)	33 ml
Anhydride chromique pur	5 g
Iodate de potassium	1 g

On chauffe le mélange à environ 160 °C pour dissoudre l'iodate et l'anhydride chromique. La solution est conservée dans un flacon bouché à l'émeri dont le bouchon est protégé des poussières par un petit bécher renversé.

Réactif II : (mélange solide). VAN SLYKE, PLAZIN, WEISIGER (1951) :

Anhydride chromique	2 g
Iodate de potassium	1 g

Réactif III : (solution d'hydroxyde de sodium environ normale).

Cette solution se prépare à partir de lessive de soude saturée dont on prend 7 ml qu'on amène à 100 ml avec de l'eau distillée fraîchement bouillie.

Réactif IV : (solution moléculaire de chlorure d'ammonium) :

Chlorure d'ammonium	53,5 g
Eau distillée, compléter à	1 000 ml.

Réactif V : (solution demi-moléculaire de chlorure de baryum)

Chlorure de baryum	122 g
Eau distillée, compléter à	1 000 ml.

Réactif VI : (eau de baryte environ décimale) :

20 g de baryte hydratée sont dissous dans un litre d'eau distillée.
La solution est filtrée avant l'emploi.

C) Appareillage

a) APPAREIL DE MINÉRALISATION. — (fig. 2 *a*). Cet appareil est entièrement construit en verre pour éviter les apports de carbone par des joints de caoutchouc ; il est constitué de quatre éléments :

- Un absorbeur de gaz carbonique.
- Une fiole de minéralisation.
- Deux barboteurs.

Ces différentes parties sont reliées entre elles comme l'indique la figure 2a par des rodages sphériques.

L'absorbeur de gaz carbonique est un flacon laveur à plaque frittée de 500 ml rempli de chaux sodée qui permet d'obtenir de l'air décarbonaté.

La fiole de minéralisation est un ballon à long col de 20 ml qui comprend un diverticule latéral de 8 à 10 ml. Il est obturé par un bouchon rodé sur lequel s'adaptent un tube barboteur et un réfrigérant intérieur.

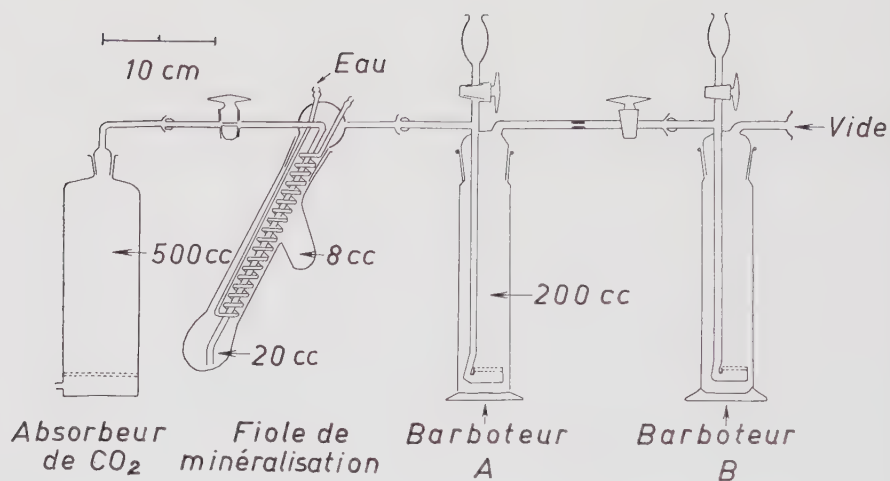
Les barboteurs sont des flacons laveurs de 200 ml à verre fritté n° 3 ; un entonnoir surmonte les appareils pour permettre l'introduction des réactifs.

b) APPAREIL DE FILTRATION. — (Fig. 2 *b*). Il est constitué par un entonnoir sur lequel est soudé un verre fritté dont la surface supérieure est à niveau, le bord rodé de l'entonnoir s'applique sur le bord rodé d'une allonge entre lesquels on insère une rondelle de papier filtre destinée à recevoir le précipité de carbonate de baryum. Cet appareil est ajusté sur une fiole à vide reliée à une trompe à eau (HENRIQUES, KISTIAKOWSKY, MARGNETTI et SCHNEIDER, 1946).

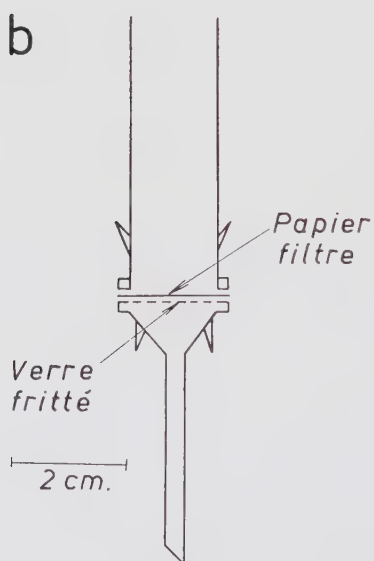
D) Technique

La substance pesée, introduite dans la fiole de minéralisation avec le réactif oxydant, est détruite à chaud avec formation de gaz carbonique. Un courant d'air décarbonaté obtenu à l'aide d'un

a



b



c

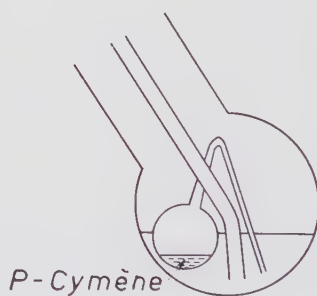


FIG. 2. — Appareillage de minéralisation.

- a) Schéma de l'appareil de minéralisation.
- b) Schéma de l'appareil de filtration.
- c) Disposition des échantillons de *p*-cymène dans la fiole de minéralisation.

léger vide entraîne l'anhydride carbonique, qui est absorbé dans le barboteur A, rempli d'hydroxyde de sodium en solution diluée. On vérifie que la capture de CO_2 est totale, à l'aide d'une solution d'hydroxyde de baryum contenue dans le barboteur B.

La minéralisation se fait sur des prélèvements contenant au maximum 10 mg de carbone; selon la nature de l'échantillon minéralisé, on opère de différentes manières :

a) Substances solides : dans une petite nacelle de verre, on pèse la substance qui est ensuite introduite au fond de la fiole.

b) *p*-cymène : la pesée de l'hydrocarbure se fait dans une ampoule à toxique à effilure recourbée (fig. 2 c) qui trempe par la suite dans la fiole, dont le fond est garni de un à deux millilitres du mélange de minéralisation (réactif I).

c) Echantillons hydratés : lorsque la substance à minéraliser contient de l'eau, il y a lieu de l'éliminer par addition d'anhydride phosphorique à raison de 300 mg pour 100 mg d'eau, quantité qu'il convient de ne pas dépasser (HEALD 1951).

La conduite des opérations est ensuite identique dans tous les cas. Un millilitre de mélange oxydant (réactif I) par milligramme de carbone est versé dans le diverticule latéral de l'appareil, en ayant soin d'en introduire toujours un minimum de 5 ml. Si l'échantillon est très riche en carbone, on ajoute environ 100 mg du mélange oxydant solide (réactif II).

L'appareil est monté comme le montre la figure 2a en prenant soin d'éviter les fuites. Un léger courant d'air est établi à l'aide du vide, le réfrigérant interne est mis en route. Par l'entonnoir qui surmonte le barboteur A, on fait arriver 125 ml d'une solution d'hydroxyde de sodium décarbonatée, telle que, la quantité de soude qu'elle contient, soit grossièrement cinq fois supérieure à celle, qu'il faut théoriquement pour absorber le gaz carbonique dégagé au cours de la minéralisation (soit 0,8 ml de solution d'hydroxyde de sodium normale par mg de carbone).

Le barboteur rempli d'eau de baryte (réactif VI) permet de vérifier que l'absorption du gaz carbonique dans la solution de soude a été totale.

Après avoir constaté que le courant d'air n'excède pas un débit de 10 ml par minute, on fait pivoter autour de son rodage la fiole de minéralisation, de façon que le mélange minéralisant vienne au contact de la substance organique. Le ballon est chauffé doucement jusqu'à une ébullition modérée, qui est entretenue cinq minutes. On laisse enfin refroidir en maintenant le courant d'air pendant au moins une heure.

Précipitation. — La précipitation de l'anhydride carbonique fixé dans la solution d'hydroxyde de sodium est obtenue par addition de chlorure d'ammonium et de chlorure de baryum au bain-marie bouillant. Un échantillon de surface constante est préparé

par filtration, pour permettre une mesure de la radioactivité. Il est nécessaire d'effectuer ces opérations à l'abri de l'air, pour éviter les apports de gaz carbonique atmosphérique.

Pour ce faire, une partie aliquote de solution sodique contenue dans le barboteur A est prélevée, de façon que le carbonate de baryum obtenu après précipitation, pèse de 10 à 30 mg (1 mg de carbone fournit 16,4 mg de carbonate de baryum). Les prélèvements sont additionnés d'un volume de chlorure d'ammonium (réactif IV) égal à celui de soude normale qui y est contenu, puis du double de chlorure de baryum (réactif V), on porte quelques minutes au bain-marie bouillant, puis laisse refroidir.

Préparation de l'échantillon pour le comptage. — L'échantillon se prépare sur des rondelles de papier filtre tarées, qu'on serre à l'aide de ressorts entre les deux parties de l'appareil de filtration précédemment décrit.

On crée la dépression dans la fiole à vide et verse la suspension dans l'allonge, le précipité se dépose rapidement, il est lavé deux fois à l'eau distillée chaude, deux fois à l'eau distillée bouillie et refroidie, en prenant soin de toujours laisser le carbonate de baryum déposé recouvert d'un peu de liquide. Un rinçage à l'acétone et à l'éther permet de déshydrater en grande partie le filtre qui est alors détaché, séché à l'étuve à 37 °C et pesé.

Corrections de pesée du précipité de carbonate de Baryum. — Il faut apporter à la pesée du carbonate de baryum sur le filtre, deux corrections, par suite, d'une part, des variations de poids du filtre au cours des manipulations et, d'autre part, de la présence de carbone dans les réactifs.

Correction du poids du filtre : la double pesée du carbonate de baryum déposé sur le filtre ne tient pas compte des variations « *a* » du poids de ce dernier, dont l'humidité change au cours du traitement. « *a* » est déterminé par les pesées successives d'une rondelle de papier filtre, identique avant et après qu'elle ait subi le même traitement. « *a* » est positif s'il y a diminution de poids, négatif dans le cas contraire.

Le poids « *P* » du carbonate de baryum déposé sur un autre filtre est égal au poids mesuré additionné de « *a* ».

Correction du poids de carbonate de baryum apporté par les réactifs. Une manipulation à blanc fournit un précipité du poids « *b* » qu'il faut retrancher du poids de carbonate de baryum déposé « *P* » pour obtenir le poids réel « *p* » du carbonate de baryum provenant de la minéralisation de la substance organique.

A partir de « *p* » il est possible de vérifier le rendement de cette minéralisation puisque 16,4 mg de carbonate de baryum correspondent à 1 mg de carbone.

E) Discussion

Les méthodes que nous venons de décrire ont été adaptées aux propriétés physicochimiques du *p*-cymène et les résultats ont été vérifiés reproductibles.

1) ENTRAÎNEMENT ET CAPTURE DU GAZ CARBONIQUE

Il nous a été impossible d'utiliser les techniques, telles que, celles de BARKER (1949) qui mettent à profit la diffusion rapide du gaz carbonique dans le vide pour l'absorber dans un mélange alcalin ; en effet, le *p*-cymène volatil, serait déplacé avant la minéralisation, au cours de la purge de l'appareil.

Nous avons entraîné l'anhydride carbonique par un courant d'air décarbonaté qui balaye l'appareil pendant la minéralisation, puis, capturé le gaz carbonique dans une solution alcaline.

Les mélanges alcalins proposés sont nombreux. Certains auteurs, tels que PETERS et GUTMAN, (1953), préconisent une solution d'hydroxyde de baryum que Van NIEUWENBERG et HEGGE, (1951) mélangent avec de l'aniline et de l'alcool pour améliorer la fixation du gaz. Mais ces conditions rendent difficile la récupération totale du précipité dont une partie reste collée sur les parois du barboteur ; il est préférable de fixer d'abord le gaz sous forme soluble, puis de le précipiter ultérieurement. Nous avons utilisé une solution d'hydroxyde de sodium qui est le mélange le plus usuel, bien que, SWICK, BUCHENAN et NAKAO (1952) ou MOSS (1961) préfèrent capturer le gaz carbonique à l'aide d'une solution d'amines dans différents solvants.

La soude utilisée doit être décarbonatée ; l'emploi d'une solution saturée d'hydroxyde de sodium nous a permis d'obtenir des résultats satisfaisants. En effet, l'apport de carbone par ce réactif n'excède par 0,5 mg de carbonate de baryum par ml de solution normale. Dans le cas où l'on veut éliminer totalement le gaz carbonique des réactifs, il faut utiliser de la soude préparée à partir du sodium (TREADWELL et HALL, 1942).

2) CONDITIONS DE PRÉCIPITATION

Il nous a paru utile de décrire dans le détail la préparation des échantillons de carbonate de baryum, car ceux-ci servent à la mesure de la radioactivité dans un compteur de Geiger Muller sans fenêtre, dit à courant gazeux (« gaz flow counter »).

Notre attention a été attirée par la difficulté d'éviter le dépôt de particules radioactives sur les électrodes du compteur à la suite d'un déplacement, soit par le courant gazeux, soit par les charges électriques.

CALVIN et coll. (1960) estiment, que les conditions de précipitation du gaz carbonique par l'hydroxyde de baryum ont une grande importance, sur les qualités finales de précipité de carbonate de baryum. Nous avons précisé le mode opératoire qui permet, tout en ayant une précipitation totale, d'obtenir une suspension facile à filtrer, possédant des caractères physiques favorables à la préparation d'échantillons pour les mesures de la radioactivité.

Une solution de carbonate acide de potassium à 8,33 g/litre, soit, 1 mg de carbone par ml, a été soumise à une série d'essais de précipitation par le chlorure de baryum dans différentes conditions de température, d'alcalinité et de salinité. 5 ml de solution de carbonate acide de potassium sont précipités (tableau II).

TABLEAU II

Volumes en ml des réactifs mélangés dans différentes conditions pour obtenir un précipité de carbonate de baryum

Essais N°	Conditions opératoires de précipitation	Volume en ml des solutions de :					
		KHCO ₃	Eau	OHNa N	OHNa 2N	NH ₄ Cl M	BaCl ₂ M/2
Temp. de 20°C 1	Solution alcaline 0,20 N. tamponnée	5	4	3	0	3	6
Temp. de 100°C 2	Solution alcaline 0,20 N. tamponnée	5	4	3	0	3	6
3	Solution alcaline 0,20 N. tamponnée en excès	5	4	3	0	6	6
4	Solution alcaline 0,1 N. non tamponnée	5	8,5	1,5	0	0	6
5	Solution alcaline N non tamponnée	5	0	0	5	0	6

1) Dans une solution d'hydroxyde de sodium 0,2 N tamponnée par une quantité équivalente de chlorure d'ammonium à la température du laboratoire ;

2) Dans la même solution que précédemment, mais au bain-marie bouillant cinq minutes.

Puis dans ces conditions de température et de durée ;

3) Dans une solution alcaline 0,2 N tamponnée par deux équivalences de chlorure d'ammonium ;

4) Dans une solution alcaline décimorale ;

5) Dans une solution alcaline normale.

Le tableau II indique les quantités de réactifs mesurées.

Les précipités obtenus dans les essais 2 et 4 sont cotonneux, ils se décantent très rapidement et permettent une filtration et un lavage facile.

Dans les autres conditions opératoires les précipités sont fins, plus ou moins colloïdaux dans l'essai 3, cotonneux dans l'essai 5 ; leur filtration est difficile par suite du colmatage du filtre.

Le rendement de l'opération est vérifié par pesée et, après correction du carbone apporté par les réactifs, il est comparé au rendement théorique qui est de 82 mg de carbonate de baryum pour 5 ml de solution de carbonate acide de potassium à 1 mg de carbone par ml (tableau III).

TABLEAU III. — *Rendement de la précipitation du carbonate par le chlorure de Baryum dans différentes conditions*

N° Essai	Poids de CO_3Ba trouvé	Erreur en p. 100
1	80,9	— 1,2
	80,2	— 2
	80,5	— 1,7
2	82	0
	82,3	+ 0,3
	81,6	— 0,4
3	79,5	— 3
	80	— 2,5
	79	— 3,75
4	83	+ 1,25
	82,5	+ 0,5
	81,3	— 0,8
5	84	+ 2,5
	86	+ 5
	86	+ 5

Cet essai nous a permis de tirer les conclusions suivantes.

1) A froid la précipitation est incomplète et le précipité de carbonate de baryum difficilement filtrable.

2) En présence d'un excès de soude, le précipité est surchargé, soit par absorption de $(\text{OH})_2 \text{Ba}$, soit par fixation rapide du gaz carbonique de l'air (CALVIN et coll. 1960) au cours des manipulations.

3) La précipitation dans une solution de soude diluée 0,1 N, ou de soude normale, tamponnée par une quantité équivalente de chlorure d'ammonium, permet d'obtenir, avec un rendement théorique, un précipité très facile à filtrer et qui présente les caractères recherchés pour la préparation d'échantillons.

4) Un excès de chlorure d'ammonium empêche une précipitation totale du carbonate de baryum, qui a tendance à être plus ou moins colloïdal.

Il faut donc opérer à chaud, en présence de chlorure d'ammonium ajouté en quantité équimoléculaire à celle de la soude contenue dans la solution, ou, même en l'absence de ce sel, pour des solutions d'un titre inférieur à la décimalité.

3) DÉTERMINATION DE LA TENEUR EN CARBONE DE DIFFÉRENTES SUBSTANCES ORGANIQUES

Afin de vérifier le rendement de la minéralisation, nous avons déterminé la teneur en carbone de l'acide tartrique, du glucose et d'une molécule non volatile marquée au carbone 14, la méthyl 2 orthotolyl-3-quinazolone-¹⁴C-2 (MTQ) en utilisant notre technique. Les résultats obtenus, après les corrections de pesée décrites précédemment, diffèrent de moins de 5 p. 100 des résultats théoriques exprimés en carbonate de baryum (tableau IV).

Dans le cas du *p*-cymène, nous avons pris la précaution d'effectuer la prise d'essai dans une ampoule à toxique, dont l'effilure est recourbée, de façon que l'hydrocarbure distille peu à peu dans le mélange minéralisant, le bris de celle-ci en fin d'opération complète l'oxydation. De plus un réfrigérant interne est monté dans la fiole de minéralisation pour diminuer la volatilisation du composé. Dans ces conditions, les essais ont fourni des résultats aussi précis que pour les substances non volatiles (tableau IV).

TABLEAU IV. — *Dosage du carbone selon la technique de Van-Slyke et Folch dans diverses substances organiques*

Substance	Poids de la prise d'essai	Poids théorique de CO ₃ Ba à obtenir.	Poids de carbonate de baryum obtenu.	Erreurs %
Acide tartrique	41,8 mg	220 mg	215 mg	— 2,5
	28,9 mg	152 mg	154 mg	+ 1,5
	11,3 mg	59 mg	60,5 mg	+ 2,5
Glucose	20,5 mg	134 mg	133 mg	— 1
	10,2 mg	67,2 mg	68 mg	+ 0,6
MTQ (solution aqueuse)	11,26 mg	123,7 mg	117 mg	— 5,5
	12,25 mg	134,7 mg	137 mg	+ 2
	13,94 mg	153 mg	155 mg	+ 1,5
	7,63 mg	83,8 mg	81,2 mg	— 3
<i>p</i> -cymène	8,4 mg	123,2 mg	124,6 mg	+ 1,5
	14,5 mg	213,1 mg	210 mg	— 1,5
	8,7 mg	127,8 mg	122 mg	— 6
	10,7 mg	157 mg	162,5 mg	+ 3,5

4) MINÉRALISATION EN PRÉSENCE D'EAU

L'addition d'eau dans le liquide de minéralisation diminue son pouvoir oxydant. HEALD, (1951), pour pallier à cet inconvénient, préconise l'emploi d'anhydride phosphorique ajouté à la dose de 300 mg pour 100 mg d'eau. Afin d'aborder le dosage du *p*-cymène dispersé dans les milieux biologiques nous avons vérifié que la combustion de MTQ en solution aqueuse se faisait avec le même rendement qu'en milieu anhydre (tableau IV).

* * *

En résumé, la technique de minéralisation de VAN SLYKE et FOLCH, que nous avons adaptée au dosage du *p*-cymène, fournit des résultats reproductibles, avec des erreurs le plus souvent inférieures à 5 p. 100.

III. — MÉTHODE D'EXTRACTION DU *P*-CYMÈNE ¹⁴C CONTENU DANS LES ÉCHANTILLONS BIOLOGIQUES

Nous avons essayé d'extraire le *p*-cymène contenu dans les milieux biologiques après son administration aux animaux en vue, d'une part, de séparer le *p*-cymène de ses produits de dégradation, d'autre part, d'obtenir des échantillons d'activité spécifique suffisamment élevée pour permettre la mesure.

Comme les techniques d'extraction par solvants entraînent un apport de carbone important, il a été nécessaire de concentrer la radioactivité dans un mélange minéral exempt de carbone. Pour cela, nous nous sommes inspiré de la technique et de l'appareillage d'entraînement préconisé par TRUHAUT (1956) pour le dosage du benzène dans le sang. Suivant cette technique, le benzène est entraîné par un courant d'air chaud à 80 °C, puis capturé dans un mélange sulfonitrique maintenu à 0 °C, le dérivé nitré fourni est dosé par colorimétrie.

Cependant les modalités opératoires préconisées par cet auteur n'ont pu être suivies.

1° La température de 80 °C est insuffisante pour entraîner la totalité du *p*-cymène dans un temps raisonnable.

2° La captation dans un mélange sulfonitrique n'est pas conciliable avec la minéralisation par la méthode de VAN SLYKE à cause du dégagement de vapeur nitreuses.

Nous avons choisi une température plus élevée pour l'entraînement et un mélange d'acide sulfurique et d'anhydride phosphorique

pour la captation, plutôt que le mélange acide sulfurique anhydride chromique qui oxyde partiellement l'hydrocarbure et entraîne une perte de radioactivité (rendement de 30 et 35 p. 100 de la radioactivité introduite au cours de deux essais).

Pour faciliter la sulfonation nous avons maintenu le mélange à 100 °C, car la dissolution du *p*-cymène y est instantanée, alors qu'elle est lente à 0 °C. Le dérivé sulfoné obtenu est ensuite minéralisé selon la technique de VAN SLYKE et FOLCH.

A) Réactifs

Nous avons utilisé le mélange de MILLS, KURTZ, HEYEN et LIPKIN, (1948) :

Anhydride phosphorique	30 g
Acide sulfurique (D 1,84)	70 g.

B) Appareillage

Cet appareil construit entièrement en verre comprend un tube à entraînement et un barboteur de Vigreux reliés entre eux par un rodage sphérique (fig. 3).

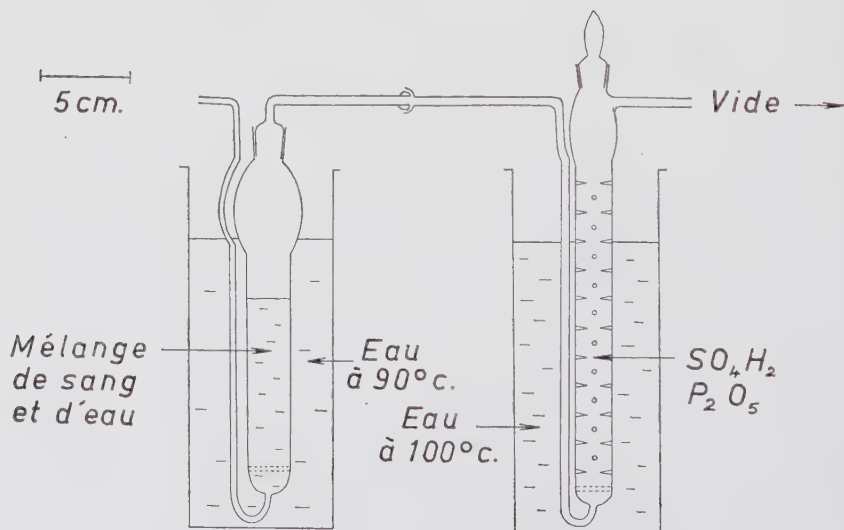


FIG. 3. — Schéma de l'appareil d'entraînement du *p*-cymène contenu dans les échantillons biologiques.

1) TUBE A ENTRAÎNEMENT. — C'est un cylindre de verre, comportant à sa partie inférieure une plaque de verre fritté n° 4, ayant pour rôle de diviser les bulles d'air amenées par un tube de faible diamètre. La partie médiane de l'appareil comporte un renflement sphérique, destiné à éviter l'ascension de la mousse, sa partie supérieure est obturée par un bouchon rodé qui communique avec le barboteur.

2) BARBOTEUR DE SULFONATION. — Ce barboteur du type de Vigreux, comporte également une plaque de verre fritté n° 4 et un évasement à sa partie supérieure.

C) Technique

L'échantillon biologique, le plus souvent du sang ou ses constituants, est introduit dans le tube à entraînement avec 30 ml d'eau et quelques gouttes d'une émulsion d'antimousse aux silicones (1) ; après agitation, le tube est relié par le rodage graissé avec l'émulsion antimousse au barboteur chauffé au B.-M. bouillant, qui contient 7 ml du réactif.

Un courant d'air de l'ordre de 1 ml par seconde, réalisé par l'aspiration d'une trompe à eau réglée à l'aide d'un robinet à pointeau, est alors maintenu pendant 4 heures à travers l'appareil d'entraînement, chauffé progressivement à 90 °C dans un bain thermostaté. Le sang coagule sous forme d'un fin précipité. Lorsque le temps de barbotage est écoulé, le barboteur est alors débranché et son contenu, ou une partie aliquote sont minéralisés selon la technique de VAN SLYKE et FOLCH, puis, précipité à l'état de $B_a CO_3$.

VÉRIFICATION DE LA MÉTHODE. — Nous avons vérifié que la fixation du *p*-cymène par le mélange acide sulfurique-anhydride phosphorique et que l'entraînement de l'hydrocarbure par le courant d'air chaud étaient complets.

Pour cela une solution étalonée de *p*-cymène ^{14}C à 2 p. 100 dans le tétrachlorure de carbone est introduite dans l'appareil à entraînement avec de l'eau, le courant d'air qui la traverse barbote successivement dans deux absorbeurs.

Le premier capte le *p*-cymène, le deuxième permet de vérifier que l'absorption est totale. Les résultats obtenus (tableau V) montrent que moins de 1 p. 100 de l'activité n'est pas arrêtée par le mélange et que l'entraînement s'effectue avec un rendement supérieur à 90 p. 100.

(1) « SISS » silicone emulsion. S. I. Antimousse AF. Soc. industrielle des silicones et produits chimiques du silicium, place des Saussaies, Paris 8^e.

TABLEAU V

Rendement de l'entraînement du p-cymène par l'air chaud.

N° de l'essai	Activité introduite		Activité retrouvée dans l'absorbeur n° 1		Activité retrouvée dans l'absorbeur n° 2	
	Volume de solution p-cymène à 2 p. 100 de CCl ₄	Activité en μ Ci	Activité en μ Ci	p. 100 dose	Activité en μ Ci	p. 100 dose
1	0,1 ml	46,5 $\pm$ 5p.100	41	89	0,25	0,5
2	0,2 ml	93 »	89,5	96	0,5	0,5
3	0,2 ml	90 »	86	95	0,1	0,1

* * *

Cette méthode un peu longue, permet de séparer dans les liquides biologiques, le *p*-cymène de ses métabolites et de mesurer l'activité de celui-ci avec une précision suffisante.

IV. — DÉTERMINATION DE LA RADIOACTIVITÉ DES ÉCHANTILLONS CONTENANT DU CARBONE-14

L'utilisation des techniques précédentes nous conduit à préparer pour les mesures de la radioactivité trois types de sources :

- sources liquides,
- précipités de carbonate de baryum,
- homogénats d'organes desséchés.

Nous allons voir, compte tenu des appareils de détection utilisés, les corrections qu'il y a lieu d'effectuer sur les mesures, pour obtenir des résultats comparatifs ou des déterminations absolues. Nous insisterons plus particulièrement sur les corrections d'autoabsorption dont nous décrirons l'évaluation avec les différents types d'échantillons utilisés.

1. — Appareils de détection

La détection du carbone-14, émetteur bêta, d'énergie maximum 0,155 Mev et d'énergie moyenne 0,04 Mev, nécessite l'emploi d'appareils sensibles. Parmi ceux-ci, les compteurs de GEIGER sans fenêtre dits « flow counter » et les scintillateurs liquides ont un excellent rendement (GLASCOCK 1954, SHARPE et TAYLOR, 1958).

Bien que le comptage par scintillation liquide soit très adapté à la détection des émetteurs bêta de faible énergie (BELL et HAYES, 1958, FUNT, 1961), nous ne l'avons utilisé, que dans un cas particulier et dans nos expériences, nous nous sommes adressé au compteur de GEIGER MÜLLER sans fenêtre de la marque S. A. I. P., ou au compteur de GEIGER à fenêtre mince d'épaisseur 1,8 mg/cm².

2. — Corrections de comptage, autoabsorption

Les mesures sont effectuées pour chaque type de source dans des conditions de géométrie précises, en vérifiant au cours de chaque manipulation les caractéristiques du compteur à l'aide de sources témoins ; Cesium 137 et carbone 14 pour le compteur à courant gazeux, oxyde d'Uranium et carbone 14 pour le compteur à fenêtre mince. Lorsque ces facteurs sont constants et que le taux de comptage est suffisamment faible pour ne pas entraîner de pertes par saturation du détecteur, il est nécessaire de déduire le mouvement propre et de tenir compte de phénomènes d'autoabsorption.

L'autoabsorption ou absorption des rayonnements par la source elle-même, n'est qu'un cas particulier de l'absorption des rayonnements β à travers la matière. Celle-ci est représentée par une relation exponentielle de la forme

$$I = I_0 e^{-\mu x}$$

I = intensité du faisceau β ayant traversé x mg/cm² de matière ;

I_0 = intensité initiale du faisceau β ;

μ = coefficient d'absorption global.

A partir de cette expression on peut déterminer l'autoabsorption : en effet, l'activité d'un échantillon de masse superficielle x mg/cm² est donnée par l'intégrale

$$\begin{aligned} Ix &= \int_0^x e^{-\mu x} dx \\ (1) \quad &= 1 - e^{-\mu x} \end{aligned}$$

La construction de la courbe correspondant à cette équation est appelée courbe de saturation, elle montre, que l'activité mesurée à partir de poids croissants de matière d'activité spécifique constante, tend vers une limite au-delà de laquelle l'activité mesurée ne dépend plus que de l'activité spécifique des échantillons.

A partir de l'équation précédente (1), on peut également construire la courbe dite d'autoabsorption

$$(2) \quad \frac{I_d}{I_0} = \frac{1 - e^{-\mu x}}{\mu x}$$

qui donne le rapport de l'activité spécifique I_d observée pour une

épaisseur x à l'activité spécifique maximum I_0 observable pour une épaisseur nulle.

L'étude de ces courbes montre qu'il existe quatre procédés pour déterminer l'activité d'un échantillon émetteur bêta (CALVIN et coll. 1949).

— Effectuer les mesures en couches infiniment minces, ce qui supprime le phénomène d'autoabsorption, mais il ne faut pas dépasser des masses superficielles de 0,1 à 0,2 mg/cm².

— Opérer à poids constant, mais l'obtention d'échantillons toujours identiques est très difficile.

— Travailler en couches suffisamment épaisses pour obtenir l'activité de saturation, l'échantillon est dit infiniment épais et le taux de comptage est proportionnel à l'activité spécifique du composé (pour le carbone la masse superficielle doit être supérieure à 25 mg/cm²).

— Déterminer expérimentalement la relation qui existe entre l'activité spécifique observable et l'épaisseur de l'échantillon. Dans ces conditions, l'activité observée pour une masse superficielle quelconque peut être reliée à celle qui est mesurée pour une épaisseur standard qui peut être nulle, infiniment épaisse ou choisie arbitrairement.

Nos expériences nous ont conduit à utiliser les deux derniers procédés.

3. — Comptage de solutions en couche infiniment épaisse

Nous avons déterminé l'activité de l'urine d'animaux traités au *p*-cymène ¹⁴C, à l'aide du compteur de GEIGER-MULLER à fenêtre mince. Le taux de comptage de un millilitre d'urine est mesuré en couche épaisse en plaçant l'urine dans une capsule. On compare les résultats obtenus à ceux mesurés dans les mêmes conditions, avec une solution étalon de carbone 14 d'activité connue. L'expérience nous a conduit à trouver 1 360 à 1 400 des/mn pour un microcurie.

4. — Comptage du carbone 14 en couche mince à l'état de carbonate de baryum

Les résultats obtenus par cette méthode sont précis et servent de référence. Les précipités d'une masse superficielle de 5 à 25 mg/cm² sont montés sur une rondelle de papier filtre selon la technique que nous avons décrite pour la minéralisation, puis, l'activité est mesurée au compteur. Bien que LIBBY (1947) pense que les corrections d'autoabsorption pour le carbone 14 peuvent se faire à partir d'une courbe unique, applicable à tous les compteurs, nous n'avons pas utilisé le coefficient d'absorption global trouvé par YANKWICH, NORRIS et HUSTON (1947) égal à $0,285 \pm 0,008$ cm²/mg. En effet,

MASSINI (1961) considère que la courbe d'autoabsorption des émetteurs bêta dépend des conditions géométriques, de la nature de l'échantillon et de l'appareil de mesure, ce qui nécessite la construction d'une courbe propre à chaque compteur. Nous avons donc construit une courbe expérimentale pour le compteur GEIGER à fenêtre mince et pour le compteur sans fenêtre en opérant de la manière indiquée par OVERMAN et CLARK (1960), mais en adoptant un coefficient qui donne le rapport de l'activité spécifique I observée pour un échantillon d'épaisseur d , à l'activité spécifique qu'il aurait, pour une épaisseur de 6 mg/cm^2 , prise comme référence (le poids des précipités est le plus souvent voisin de 15 mg pour $2,5 \text{ cm}^2$). Ce choix permet de diminuer les corrections, donc de limiter les erreurs.

Pratiquement, sur trois séries d'expériences, nous avons mesuré la radioactivité d'échantillons contenant des poids croissants (4 à 40 milligrammes pour $2,5 \text{ cm}^2$) de carbonate de baryum d'activité spécifique constante et connue, préparé par minéralisation d'un étalon de carbone 14. Ces activités étaient respectivement de $0,697$ - $0,535$ et $1,15 \text{ m}\mu\text{Ci/mg}$ de carbonate de baryum. A partir de ces mesures, on détermine l'activité spécifique apparente pour les différentes masses superficielles, en divisant le nombre de désintégrations par minutes par le poids du précipité. L'établissement de la courbe, donnant ces activités spécifiques apparentes en fonction du poids, permet de connaître l'activité à 15 mg qu'on prend comme référence égale à un. Enfin les activités spécifiques apparentes pour les différentes masses, exprimées par rapport à l'activité de référence, permettent de construire la courbe $I/I_{15 \text{ mg}}$ donnant ces rapports en fonction de l'épaisseur. Les résultats obtenus sont consignés dans les tableaux VI et VII pour le compteur à fenêtre

TABLEAU VI. — Détermination expérimentale des corrections d'autoabsorption pour le compteur de Geiger Muller à fenêtre mince ($1,8 \text{ mg/cm}^2$) avec des échantillons de carbonate de baryum.

Essai A				Essai B				Essai C			
Poids mg	Acti- vité des/m	Activité par mg des/m	$I/I_{15 \text{ mg}}$	Poids mg	Acti- vité des/m	Activité par mg en des/m	$I/I_{15 \text{ mg}}$	Poids mg	Acti- vité des/m	Activité par mg en des/m	$I/I_{15 \text{ mg}}$
6	230	38	1,41	5	140	28	1,4	4,1	270	64	1,47
10,2	350	34	1,26	11,8	257	21,8	1,09	6	380	63	1,45
13,8	390	28	1,04	15	300	20	1	7,1	395	55,5	1,28
15	405	27	1	19,6	325	16,5	0,82	8,6	490	57	1,31
20,3	450	22	0,82	23,8	360	15	0,75	10,3	580	56	1,30
26,6	455	17	0,63	29,3	366	12,5	0,61	12	570	47,5	1,09
34,8	455	12,9	0,48	37,3	370	10	0,50	13,7	655	48	1,1
37,3	460	12,2	0,45					15	652	43,5	1
42,9	480	11,2	0,41					16,7	690	41,2	0,95
								20,7	760	37	0,85
								22,7	775	34	0,78
								27,6	773	28	0,68

TABLEAU VII

Détermination expérimentale des corrections d'autoabsorption pour le compteur sans fenêtre SAIP avec des échantillons de carbonate de baryum

Essai A				Essai B				Essai C			
Poids mg	Activité des/m	activité par mg des/m	I/I _{15 mg}	Poids mg	Activité des/m	activité par mg des/m	I/I _{15 mg}	Poids mg	Activité des/m	activité par mg des/m	I/I _{15 mg}
6	2 110	350	1,59	5	1 470	294	1,8	4,1	2 630	642	1,69
10,2	3 030	298	1,35	11,8	2 170	184	1,14	6	3 620	604	1,59
13,8	3 130	224	1,02	15	2 430	162	1	7,1	4 040	570	1,5
15	3 300	220	1	19,6	2 620	134	0,83	8,6	4 920	573	1,5
20,3	3 600	175	0,80	23,8	2 900	122	0,75	10,3	4 820	515	1,35
26,6	3 800	142	0,64	29,3	2 950	100	0,63	12	5 200	433	1,14
34,8	3 700	106	0,48	37,3	2 900	78	0,48	13,7	5 370	391	1,03
37,3	3 600	97	0,44					15	5 700	380	1
42,9	3 980	94	0,43					16,7	5 820	350	0,92
								20,7	6 500	314	0,83
								22,7	6 320	278	0,73
								27,7	6 370	232	0,61

mince et le compteur à courant gazeux. Les figures 4 a et 4 b représentent les courbes, donnant les rapports I/I_{15 mg} en fonction de l'épaisseur, obtenues en effectuant la moyenne des trois essais.

Pour connaître l'activité en m μ Ci d'un prélèvement de carbonate de baryum de poids *p* donnant T des/mn, on détermine son activité à 15 mg, en se reportant à la courbe construite pour le compteur utilisé, puis on compare l'activité obtenue à celle donnée dans les mêmes conditions par des échantillons étalons. Un m μ Ci réparti dans une pastille de 15 mg de carbonate de baryum donne un taux de comptage égal à 315 des/m avec le compteur à gaz et 37,5 des/m avec le détecteur à fenêtre mince.

L'activité contenue dans un échantillon est :

$$X \text{ m}\mu\text{Ci} = \frac{T}{I_p/I_{15} \times a}$$

X = Activité en m μ Ci ;

T = Taux de comptage donné par l'échantillon ;

I_p/I₁₅ = Rapport de l'activité spécifique observée à *p* mg (poids de carbonate de baryum) à celle mesurée à 15 mg ;

a = Taux de comptage donné à 15 mg par 1 m μ Ci.

5. — Comptage du carbone 14 dans des homogénats d'organes

Dans le cas où la minéralisation n'est pas indispensable, particulièrement pour doser les métabolites du *p*-cymène, nous avons effectué les mesures sur de la pulpe d'organes desséchés.

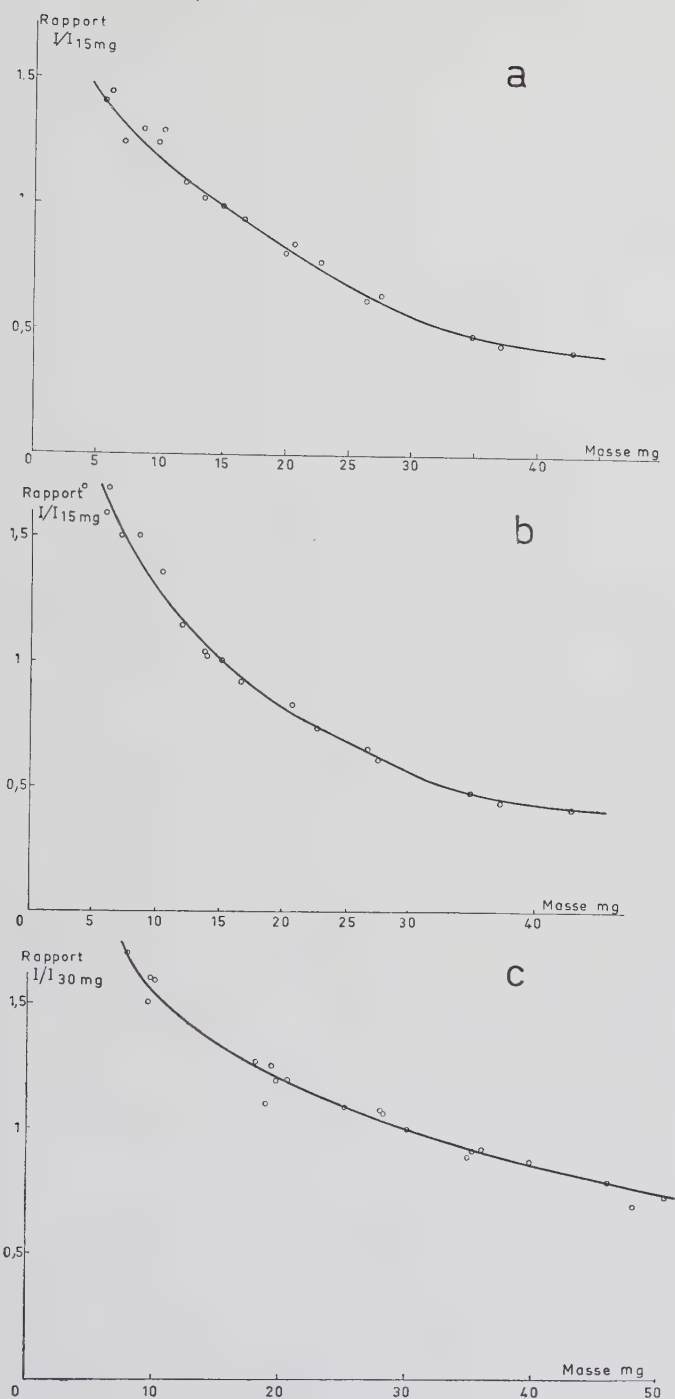


FIG. 4. — Courbes d'autoabsorption du carbone 14 :

a) Courbe d'autoabsorption $I/I_{15\text{mg}}$ pour le carbonate de baryum ^{14}C sur le compteur Geiger à fenêtre mince ($1,8\text{ mg/cm}^2$).

b) Courbe d'autoabsorption $I/I_{15\text{mg}}$ pour le carbonate de baryum ^{14}C sur le compteur sans fenêtre S. A. I. P.

c) Courbe d'autoabsorption $I/I_{30\text{mg}}$ pour les homogénats d'organes contenant du carbone 14 sur le compteur sans fenêtre S. A. I. P.

a) PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

L'organe dont on veut mesurer la radioactivité est broyé dans un tube de Potter avec trois parties d'eau glycinée à 2 p. 100, la glycérine ayant pour but d'éviter la division de l'échantillon au cours de la dessiccation.

Sur une coupelle en aluminium tarée et dégraissée dans laquelle une surface de 5 cm² a été délimitée par un anneau de graisse selon le principe préconisé par OVERMAN et CLARK (1960), on dépose 0,3 à 0,5 ml d'homogénat, afin d'obtenir après dessiccation à l'air ou à l'étuve à 37 °C pendant 24 heures, environ 30 mg de substance sèche. La pesée effectuée, l'activité du prélèvement est enfin déterminée.

Après avoir vérifié que l'autoabsorption des différents organes desséchés était indépendante de la texture des échantillons, mais non de leur masse superficielle, nous avons construit la courbe d'autoabsorption observée dans ces conditions avec le compteur sans fenêtre.

b) COMPARAISON EN FONCTION DES ORGANES DE L'AUTO-ABSORPTION DU CARBONE 14

Une même quantité de carbone 14 est ajoutée à des volumes croissants, 0,05 à 0,5 ml d'homogénats d'organes variés : foie, reins, sang, cerveau, sur lesquels des essais sont effectués en triple. Après dessiccation et pesée des résidus secs, on mesure la radioactivité des échantillons avec un compteur de GEIGER-MULLER. Pour chaque organe, les chiffres obtenus correspondent à un nombre de désintégrations par minute qui est fonction des masses superficielles croissantes. Si l'on attribue à l'activité déterminée pour une masse de 30 mg, le chiffre 1, pour des masses inférieures ou supérieures, la radioactivité mesurée est affectée d'un coefficient de correction établi d'après les résultats expérimentaux. Le tableau VIII groupe les coefficients trouvés pour le foie, le sang, le cerveau et le rein. Pour une même masse, l'activité apparente est du même ordre de grandeur aux erreurs d'expériences près.

TABLEAU VIII. — *Rapport de l'activité observée pour différentes masses superficielles à celle mesurée à 30 mg pour divers organes*

Masse en mg	Rapport trouvé			
	Foie	Sang	Cerveau	Rein
10	1,56	1,57	1,45	1,50
20	1,26	1,23	1,21	1,20
30	1	1	1	1
40	0,87	0,84	0,85	0,89

La courbe d'autoabsorption du carbone 14 est donc identique pour les tissus mous. Les corrections déterminées pour un seul organe, le foie, seront applicables à tous les organes.

c) CORRECTIONS D'AUTOABSORPTION
POUR LES HOMOGÉNATS D'ORGANES

Nous avons ajouté dans les coupelles des quantités croissantes d'homogénat de foie à une quantité fixe de carbone 14 sous forme d'une solution étalon titrée en activité. Les volumes d'homogénats sont choisis de façon à obtenir un résidu sec pesant entre 8 et 50 mg, dont on détermine la radioactivité à l'aide du compteur de Geiger sans fenêtre.

A partir de ces mesures, on construit la courbe qui donne le rapport de l'activité observée, pour un échantillon de masse superficielle égale à d mg pour 5 cm², à l'activité spécifique qu'il aurait pour une masse de 30 mg pour 5 cm² prise comme référence unitaire. Cette masse est choisie pour les mêmes raisons que dans le cas du carbonate de baryum.

Pratiquement, quatre séries d'expériences sont effectuées. Les activités déposées dans chaque coupelles sont de 3,22 m μ Ci, 6,44 m μ Ci, 12 m μ Ci et 16,1 m μ Ci dans chacune des séries. La représentation graphique donnant l'activité mesurée en fonction de la masse permet de connaître le taux de comptage à 30 mg.

Les résultats obtenus pour le compteur sans fenêtre S. A. I. P. sont consignés dans le tableau IX et la figure 4 c représente la courbe d'autoabsorption construite à partir de ces résultats.

TABLEAU IX

Détermination expérimentale des corrections d'autoabsorption pour le compteur sans fenêtre SAIP avec des homogénats d'organes desséchés

Essai 1			Essai 2			Essai 3			Essai 4		
Poids en mg	Activité des/m	I/I ₃₀ mg	poids en mg	Activité des/m	I/I ₃₀ mg	Poids en mg	Activité des/m	I/I ₃₀ mg	Poids en mg	Activité des/m	I/I ₃₀ mg
9	2 170	1,71	9,4	3 860	1,50	10,5	7 770	1,58	9,5	9 570	1,59
19	1 590	1,25	18	3 250	1,26	19,3	6 100	1,24	19,4	7 120	1,19
28,2	1 350	1,06	30	2 570	1	30	4 900	1	27,7	6 400	1,06
30	1 270	1	35,8	2 350	0,91	30,5	4 770	0,97	30	6 000	1
35,2	1 130	0,90	45,8	2 030	0,79	39,6	4 330	0,81	35,3	5 520	0,92
						50,7	3 580	0,73	48	4 170	0,69

Pour connaître l'activité d'un prélèvement, on détermine son taux de comptage à 30 mg en se reportant à la courbe précédente, puis, on compare le chiffre obtenu à celui donné dans les mêmes conditions par un échantillon étalon. Nos expériences nous mon-

trent que 1 μCi réparti dans 30 mg d'homogénat a un taux de comptage égal à 380 des/m. La formule à appliquer est identique à celle qui est utilisée pour le carbonate de baryum.

6. — Comptage par scintillation liquide

Nous avons utilisé la scintillation liquide afin de déterminer la teneur en carbone 14 de ganglions lymphatiques. Les mesures sont effectuées sur l'appareil Tracerlab L. S. C.-10 B. (1) comprenant deux photomultiplicateurs montés en coïncidence.

Le prélèvement biologique, sang ou ganglions lymphatiques, d'une masse de 5 à 50 mg est mis en contact de 2 ml d'alcool éthylique absolu dans un flacon de mesure ; puis, lorsque la substance marquée y est dissoute, on ajoute 13 ml de toluène contenant 0,4 p. 100 de D. P. O. et 0,01 p. 100 de P. O. P. O. P. (2). Dans le cas du sang, le mélange est filtré avant la mesure. On en prélève une partie aliquote qui est complétée à 15 ml avec du liquide scintillant.

Après détermination de la radioactivité, on déduit le mouvement propre. Il est possible d'exprimer les résultats en poids de *p*-cymène, par comparaison avec la mesure de l'activité d'une dilution de l'hydrocarbure utilisé, préparé dans les mêmes conditions.

Nous avons vérifié l'absence d'autoextinction au cours des comptages dans les échantillons ainsi préparés et constaté que l'eau, le sang et les ganglions ne modifiaient pas le rendement du scintillateur.

V. — PROPRIÉTÉS PHYSIQUES, SYNTHÈSE ET CONTRÔLE DU *P*-CYMÈNE (^{14}C)-7

Le *p*-cymène ou paraméthylisopropylbenzène est un hydrocarbure liquide dont les caractéristiques sont les suivantes :

- Poids moléculaire 134 ;
- Point de fusion $-73\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- Point d'ébullition $+176\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- Densité $^{20}_{4}$ 0,856.

Très soluble dans l'éther, l'alcool éthylique, le chloroforme et les lipides, ce composé est insoluble dans l'eau.

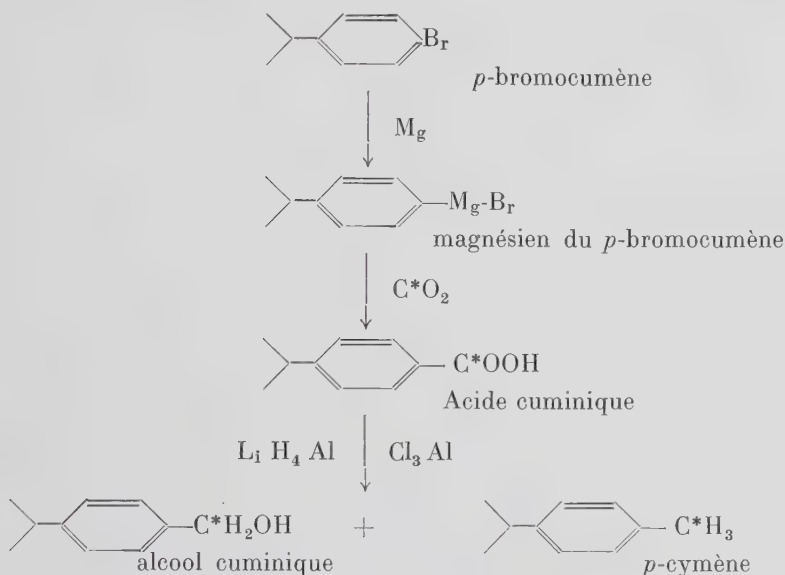
Le *p*-cymène a été marqué au carbone 14 en sept par GUERMONT et PICHAT (1959). Nous avons contrôlé son activité spécifique par notre méthode de minéralisation.

(1) Liquid scintillation counting system L.S.C.-10 B., fabriqué par Tracerlab inc. Reactor monitoring center, Richmond, California.

(2) — DPO : Diphényl, 2-5 oxazole.

— POPOP : di(phényl-2-oxazolyl) 5-benzène 1-4.

Schéma de la synthèse du *p*-cymène



Synthèse du *p*-cymène ¹⁴C-7 (1)

Le principe de la synthèse est le suivant : l'acide cuminique (¹⁴COOH) est préparé par carbonatation sous vide du magnésien du *p*-bromocumène, puis, le composé obtenu est réduit directement par l'hydruire d'aluminium lithium en présence de chlorure d'aluminium sous forme d'alcool cuminique et de *p*-cymène. Le mélange est séparé par chromatographie en phase vapeur qui permet d'isoler le *p*-cymène pur. Le schéma ci-dessus représente les différentes phases de la synthèse.

Pureté et activité spécifique du *p*-cymène

La chromatographie en phase vapeur montre que le produit de synthèse ne contient que le paracymène au moment de la préparation. Son activité spécifique est de 3 mCi par millimole, le poids de l'échantillon dont nous disposons est de 150 mg.

Nous avons nous même vérifié la pureté d'un intermédiaire de la synthèse, l'acide *p*-isopropylbenzoïque ou acide cuminique. La

(1) Nous remercions le Commissariat à l'énergie atomique qui nous a fourni gracieusement le *p*-cymène marqué et Monsieur PICHAT, chef de la section des molécules marquées qui a accepté d'en effectuer la synthèse avec la collaboration de Monsieur GUERMONT.

chromatographie descendante sur papier Whatman n° 1 pendant huit heures avec un solvant alcalin (butanol : 1, ammoniacque 1,5N : 1.), montre que l'acide cuminique radioactif ne donne par autoradiographie qu'un seul spot de Rf 0,59, identique à celui d'un produit de référence.

Nous avons également contrôlé la pureté de l'hydrocarbure au moment des expériences en mesurant le résidu fixe contenu dans le *p*-cymène. Ce résidu négligeable en octobre 1959 (0,2 à 0,3 %) s'est progressivement élevé pour atteindre 2,5 p. 100 en décembre 1962.

Pour effectuer les expériences, le composé marqué est dilué dans du *p*-cymène inactif EASTMAN KODAK redistillé à 175-176 °C, afin d'obtenir une activité spécifique de 1009 μ Ci par gramme. Cette activité est contrôlée sur des dilutions de la solution précédente. Les résultats trouvés concordent à 5 p. 100 près avec les indications de GUERMONT et PICHAT (tableau X).

TABLEAU X

Contrôle de l'activité spécifique du *p*-cymène à 1009 μ Ci par gramme

N° de l'essai	Dilution en poids	Poids de <i>p</i> -cymène minéralisé mg	Rendement de la minéralisation			activité spécifique μ Ci/g	
			Poids théorique de CO ₃ B _a mg	Poids de CO ₃ B _a trouvé mg	Erreur en %	Activité de la dilution	Activité du <i>p</i> -cymène
1	1/48,5	10,7	157	162,5	+ 3,5	21,9	1 060
2	1/38	8,7	127,8	125	— 2	26,2	990
3	1/48	11,3	166	170,8	+ 3	20,4	980

A partir du *p*-cymène à 1009 μ Ci par gramme, nous avons utilisé selon la nature des essais, des dilutions de cette préparation ayant une activité spécifique de deux cents, cent ou cinquante μ Ci par gramme.

Le *p*-cymène qui nous a servi dans nos expériences avait donc une activité spécifique convenable et il n'a subi qu'une radiolyse très légère durant la durée des essais.

CONCLUSION

Nous avons exposé les méthodes d'analyse dont nous disposions pour détecter et doser le carbone 14 et nous avons décrit quelques modifications nécessitées par les propriétés particulières du *p*-cymène.

La détection par autoradiographie a été possible en alliant les

avantages de la méthode de ULLBERG (1954) modifiée par COHEN et DELASSUE (1959) et de la méthode de PELLERIN (1957).

Les déterminations quantitatives du *p*-cymène dans les tissus ont été abordées à l'aide de la technique de minéralisation de VAN SLYKE et FOLCH (1940), soit directement, soit après isolement de l'hydrocarbure. Le dosage des métabolites du composé a été effectué sur des homogénats d'organes desséchés. Lorsque les activités à mesurer étaient trop faibles pour permettre la minéralisation, nous avons employé la scintillation liquide.

L'activité spécifique et la pureté du *p*-cymène employé ont enfin été vérifiées.

DEUXIÈME PARTIE

ÉTUDES QUALITATIVES DE LA PERMÉABILITÉ CUTANÉE

L'absorption percutanée est un phénomène complexe, consistant en une pénétration des substances du milieu extérieur dans la peau et à travers cette dernière dans la circulation sanguine ou lymphatique. Cette définition implique la succession de 2 phases : tout d'abord une phase de pénétration transépidermique, qui est le passage à travers l'épiderme ou les appareils pilo-sébacés jusqu'au derme où la substance se répartit dans les espaces extravasculaires ; ensuite une phase de résorption sanguine ou lymphatique qui entraîne le composé dans l'organisme.

Nous essayerons d'analyser successivement ces deux stades de l'absorption percutanée. Nous opérerons toujours sur l'animal vivant, car les techniques *in vitro* ne rendent pas compte de la deuxième phase de la pénétration, de plus, le fait de travailler sur des tissus en survie est très éloigné des conditions physiologiques.

Après une étude de la pénétration à travers l'épiderme de différentes espèces animales, nous estimerons globalement la vitesse de l'absorption, puis nous terminerons par l'analyse du transport sanguin et lymphatique qui représente la phase ultime de la résorption cutanée.

Ce travail nous conduira à aborder des problèmes non directement en relation avec la pénétration cutanée afin d'en éclaircir le mécanisme ; c'est ainsi que nous avons étudié le métabolisme du *p*-cymène et comparé l'absorption cutanée à la pénétration à travers les barrières pulmonaire, placentaire et hématoencéphalique.

CHAPITRE IV

ABSORPTION PERCUTANÉE DU *p*-CYMÈNE CHEZ DIVERSES ESPÈCES ANIMALES

Nous avons commencé notre étude en essayant de mettre en évidence de manière directe, par autoradiographie, les voies de passage des substances lipophiles à travers la peau. Nous compléterons les expériences de JOACHIMOGLU (1924) et de VALETTE, CAVIER, TRUHAUT et RUCARD (1956) qui ont montré par les techniques de détection histologique que les solvants chlorés colorés à l'aide de vert malachite se localisent de façon préférentielle dans les appareils pilo-sébacés.

Nous effectuerons tout d'abord une série d'expériences préliminaires chez la Souris pour contrôler la pénétration et détecter la localisation du *p*-cymène dans l'organisme de cet animal ; puis nous nous efforcerons de rechercher les voies de l'absorption de l'hydrocarbure, à travers la peau de diverses espèces animales qui possèdent des structures cutanées plus ou moins particulières (Chien, Lapin et Raton), afin d'analyser le rôle respectif de l'épiderme et des appareils pilo-sébacés au cours de l'absorption percutanée.

Dans tous les cas, le principe de la méthode est le suivant : le *p*-cymène est appliqué sur la peau, préalablement recouverte d'un appareil qui évite l'évaporation du composé marqué et laissé en contact pendant un temps variable. Lorsque le délai est écoulé, l'animal entier ou une biopsie cutanée sont congelés dans l'azote liquide, puis débités au microtome à congélation selon la technique que nous avons décrite au chapitre III. Les autoradiographies obtenues comparées aux coupes de référence, à l'œil nu ou au microscope, localisent exactement le carbone 14 provenant du *p*-cymène ou de ses dérivés de dégradation.

I. — ÉTUDE AUTORADIOGRAPHIQUE DE LA PÉNÉTRATION DU *p*-CYMÈNE A TRAVERS LA PEAU DE SOURIS

Nous avons essayé de mettre simultanément en évidence la traversée de la peau et la localisation du *p*-cymène et de ses métabolites dans les organes de la Souris.

Appareillage

L'appareil de contention utilisé est constitué par un tube en matière plastique (fig. 5), fermé par un couvercle destiné à introduire la Souris, l'autre extrémité est obturée par un anneau de caoutchouc, qui permet le passage de la tête de l'animal maintenue par un collier métallique. Cet appareil évite que le *p*-cymène appliqué sur la peau du dos ne soit en partie absorbé par la voie respiratoire.

Technique

Sur la peau du dos de 18 Souris pesant environ 20 g, tondues aux ciseaux courbes et placées dans l'appareil de contention, on dépose 0,1 ml de *p*-cymène à 200 $\mu\text{Ci/g}$ qui s'étale sur une surface

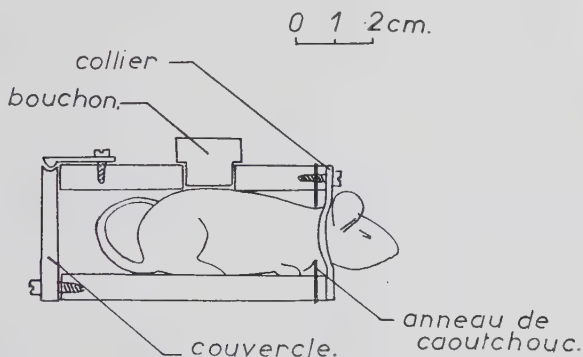


FIG. 5. — Schéma de l'appareil de contention pour l'administration cutanée du *p*-cymène.

d'environ 25 cm². Les animaux en nombre variable pour chaque expérience, sont sacrifiés par immersion dans l'azote liquide après un contact de l'hydrocarbure sur la peau de durée croissante : une Souris à quinze minutes, trois à trente minutes, six à une heure, cinq à deux heures et trois à trois heures. Les autoradiographies sont obtenues par exposition de 8 jours de film Kodirex sur les coupes desséchées, et exposition de 15 jours sur les blocs congelés.

Résultats

La pénétration de l'hydrocarbure est décelable dès la quinzième minute. L'absorption croît en fonction du temps de contact comme l'indique le noircissement des films. Au-delà de deux heures d'exposition, on assiste à des phénomènes d'intoxication, accompagnés de mort pour plus de trois heures de contact.

Les deux types de clichés obtenus montrent qu'à côté de la radioactivité volatile attribuable au *p*-cymène, il apparaît une radioactivité fixe dont la proportion augmente au cours du temps. Cette superposition rend difficile la localisation du *p*-cymène. Néanmoins au bout d'une heure (fig. 6 *a*) il est possible d'observer une forte concentration de l'hydrocarbure dans les graisses brunes interscapulaires et péritonéales, et une abondance particulière de dérivés non volatils dans le foie et la bile (fig. 6 *b*), les reins et la vessie, les autres organes étant plus faiblement imprégnés.

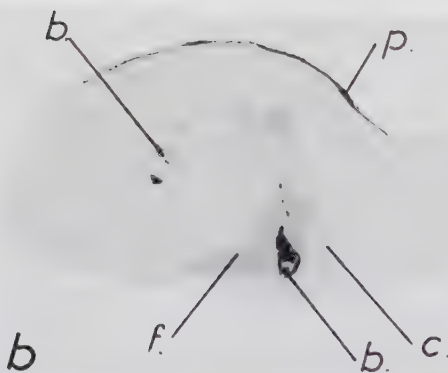
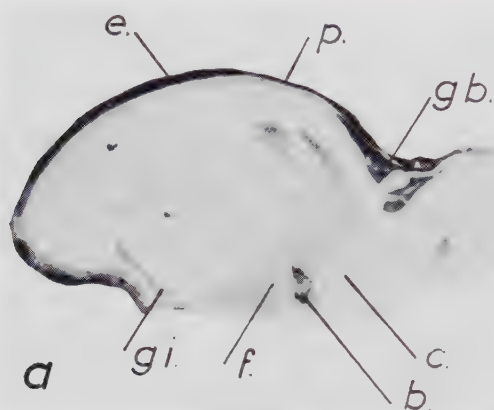


FIG. 6. — Autoradiographies de Souris entières après pénétration percutanée du *p*-cymène ^{14}C pendant 1 heure.

a) radioactivité totale. *b*) radioactivité fixe. *b* : bile, *c* : cœur ; *e* : excès de *p*-cymène ; *f* : foie ; *gb* : graisse brune ; *gi* : graisse péritonéale ; *p* : peau.

Au niveau de la peau, la présence de poils trop nombreux empêche de préciser la répartition du *p*-cymène dans les structures cutanées. Pourtant, on distingue une zone peu imprégnée entre la surface cornée et les graisses hypodermiques qui sont toutes deux fortement radioactives.

En résumé, l'emploi d'une molécule marquée nous a permis de mettre directement en évidence la pénétration percutanée du *p*-cymène. En effet, jusqu'ici il n'existait aucune preuve réelle de cette absorption, bien que VALETTE et CAVIER (1954), MEYER et KERK (1960) aient montré que le *p*-cymène facilite la traversée de la peau par l'ésérine, sans apporter la preuve que l'hydrocarbure accompagne l'alcaloïde pendant la pénétration.

L'absorption est suivie d'une dégradation par l'organisme de l'hydrocarbure en substances non volatiles dont nous étudierons l'origine ultérieurement.

La toxicité non négligeable du *p*-cymène nous conduit à adopter pour la suite des expériences, une durée de contact sur la peau ne dépassant pas deux heures.

II. — ÉTUDE AUTORADIOGRAPHIQUE DE LA PÉNÉTRATION DU *P*-CYMÈNE A TRAVERS LA PEAU DU CHIEN (1)

Nous avons repris sur le Chien l'expérience précédente afin d'établir le rôle des appareils pilo-sébacés qui chez cet animal sont assez volumineux.

Structure de la peau du chien

La peau du Chien présente quelques particularités anatomiques (TRAUTMANN et FIEBIGER, 1952) : dans l'épiderme, le corps muqueux de Malpighi a une épaisseur faible, constante, ne comportant que trois ou quatre assises cellulaires ; les appareils pilo-sébacés sont complexes, formés par plusieurs follicules qui se réunissent en groupe en une ouverture commune, les glandes sébacées associées à chaque poil étant très volumineuses ramifiées et enroulées en forme de massue ; l'hypoderme est bien développé. Enfin il n'existe pas de glandes sudoripares, mais des glandes apocrines sécrétrices de lipides.

(1) Cette étude a été présentée en collaboration avec M. le Doyen G. VALETTE à l'Académie des Sciences : *C. R. Acad. Sci.* 1962, 254, p. 2092-2094.

Technique

Le Chien est anesthésié au penthiobarbital sodique à la dose de 30 mg/kg par voie intra-veineuse. La peau du dos et de la face interne de la cuisse est tondue aux ciseaux. On dépose sur ces régions délimitées par une cloche de verre à tubulure de 4 à 6 cm² de surface, appliquée à l'aide de colle de Unna (1), 0,1 ml de *p*-cymène ¹⁴C à 200 μ Ci/g. Le contact est limité à 30 minutes, 1 heure et 2 heures. Le fragment de peau est alors prélevé, replié sur lui-même, introduit dans un sac de polythène et congelé dans l'acétone refroidi à —78 °C. La fin de l'expérience est conduite suivant la technique décrite au chapitre III. La surface du bloc est exposée sur film Dentus rapid pendant 15 jours à —30 °C.

La coupe de référence colorée sur le ruban adhésif d'acétate de cellulose au bleu de toluidine phéniqué, est comparée au microscope avec le film impressionné pour localiser la radioactivité.

Résultats

Quoique l'organisation de l'appareil pilo-sébacé soit différente à la face interne de la cuisse et sur le dos, les autoradiographies obtenues sur dix Chiens ne présentent de différences légères qu'en fonction du temps.

On observe à la surface de la peau une imprégnation importante due à l'excès de l'hydrocarbure qui épouse les contours du tégument, sans pénétrer de façon apparente dans les couches internes de l'épiderme (fig. 8). Le composé marqué nettement décelé dans les follicules pileux et les glandes sébacées jusqu'au niveau du canal excréteur de ces dernières, n'atteint pas, même pour les expériences où le temps de contact est porté à 2 heures, la partie inférieure du poil à partir de la gaine épithéliale interne (fig. 8).

Dans les couches plus profondes de la peau, derme et hypoderme, le carbone ¹⁴ n'est détecté que dans les graisses de l'hypoderme (fig. 7) dont la radioactivité est d'autant plus grande que le temps de contact est plus prolongé.

Le fait que les coupes desséchées n'impressionnent pas le film radiographique montre que le carbone ¹⁴ décelé à l'intérieur de la peau est entièrement volatil et qu'il provient du *p*-cymène.

La radioactivité se trouve concentrée dans les régions cutanées riches en lipides. Le *p*-cymène par ses propriétés lipophiles peut traverser la barrière constituée par le sébum et les graisses de la peau, atteindre les canaux excréteurs et les parois des glandes

(1) La colle de UNNA est préparée par mélange à chaud de gélatine 30 g, oxyde de zinc 15 g, glycérine 25 g et eau 45 g qu'on fond au bain-marie au moment de l'emploi.

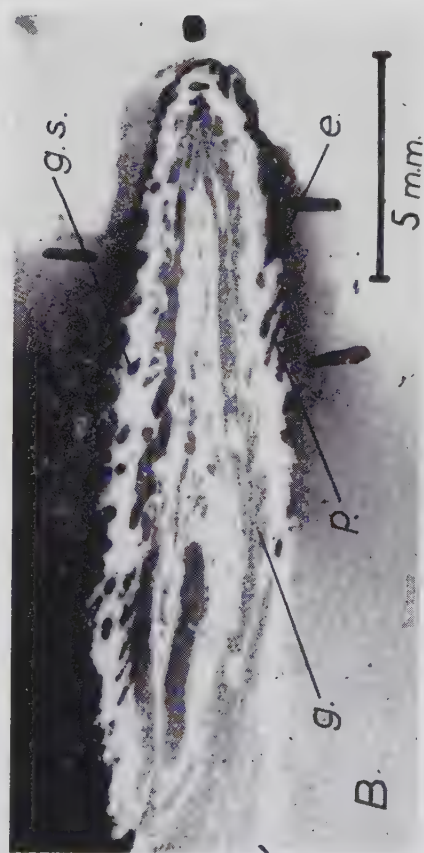
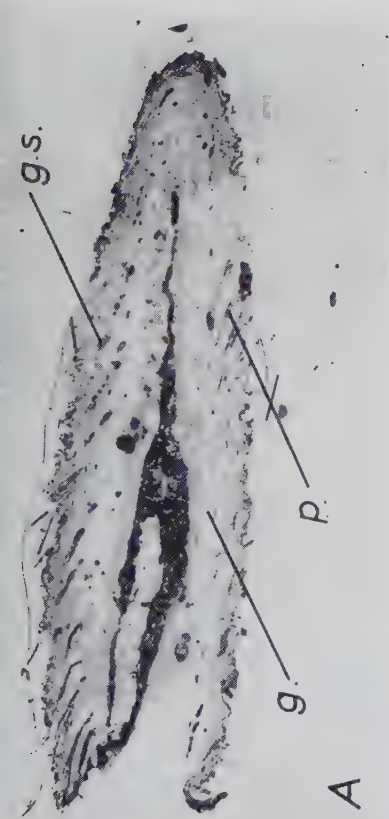


FIG. 7

FIG. 7. — Coupe de peau de Chien repliée sur elle-même (A) et autoradiographie correspondante (B), aspect général. *e*, excès de *p*-cymène à la surface de la peau ; *p*, follicules pileux ; *gs*, glandes sébacées ; *g*, graisse de l'hypoderme.

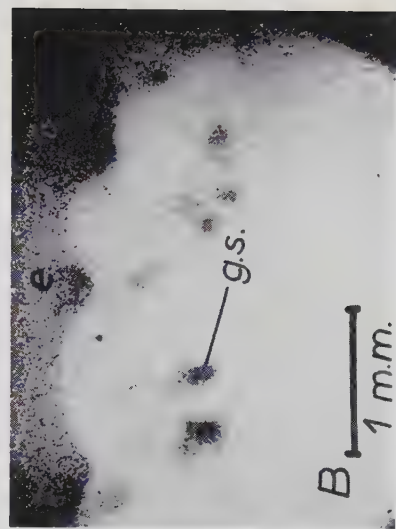
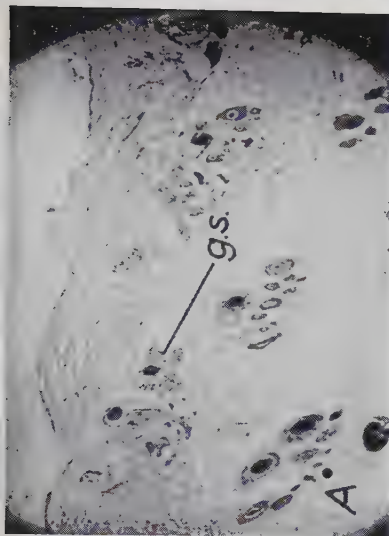


FIG. 8

FIG. 8. — Coupe de peau de Chien (A) et autoradiographie correspondante (B) : détail. *e*, excès de *p*-cymène à la surface de la peau ; *gs*, glandes sébacées (noter que les follicules pileux ne sont radioactifs que jusqu'au niveau des glandes sébacées).

sébacées qui ne sont séparés du tissu conjonctif environnant que par quelques couches de cellules beaucoup plus perméables que les couches vivantes de l'épiderme (ROTHMANN, 1954). Ce fait favorise la pénétration dans l'organisme comme l'atteste l'imprégnation des graisses de l'hypoderme. Par contre, la partie profonde des follicules pileux, n'est pas atteinte par suite du faible taux de lipides dans cette région.

L'épiderme ne semble pas être traversé de manière directe. Pourtant, ce passage n'est pas exclu car, d'une part la circulation peut entraîner très rapidement l'hydrocarbure et empêcher sa détection sous la peau, comme l'ont constaté AXELROD et HAMILTON, pour la lewisite (1947) et, d'autre part l'épiderme se laisse traverser par des substances comme le tributylphosphate ^{32}P (TREGGAR, 1961) et l'hydrocortisone 14 C (SCOTT et KALZ, 1956). Ces modalités de pénétration pouvant se dérouler dans le cas du *p*-cymène, nous avons poursuivi notre série d'essais sur la peau d'autres animaux.

III. — ÉTUDE AUTORADIOGRAPHIQUE DE LA PÉNÉTRATION PERCUTANÉE DU *p*-CYMÈNE A TRAVERS LA PEAU DE L'OREILLE DU LAPIN

Nous avons cherché à confirmer chez le Lapin, le rôle dans l'absorption, de structures cutanées différentes de celles du Chien.

Structure de la peau de l'oreille du lapin

La peau de la face supérieure de l'oreille du Lapin est mince. On peut y remarquer que la couche cornée a une faible épaisseur, que des follicules pileux très larges avec de nombreux poils fins, associés à des glandes sébacées globuleuses s'enfoncent dans le derme, et que l'hypoderme est dépourvu de pannicules adipeux.

Technique

Le Lapin est anesthésié par injection intra-veineuse d'uréthane à la dose de 1 g par kg de poids corporel. On dépose au centre de la face externe du lobe de l'oreille épilé aux ciseaux courbes, 0,1 ml de *p*-cymène à 200 $\mu\text{Ci/g}$, dont on prévient l'évaporation en fixant au préalable à l'aide de colle de Unna une cloche à tubulure recouvrant une surface de 4 à 6 cm^2 . Après 30 à 45 minutes d'exposition, des autoradiographies d'un fragment de l'oreille congelée sont préparées par la technique déjà décrite.

Résultats

Les clichés obtenus chez 5 Lapins (fig. 9) permettent de localiser à la surface de la peau de l'oreille une forte radioactivité due à l'excès de l'hydrocarbure et de noter une faible pénétration dans les couches profondes de l'épiderme, l'imprégnation des glandes sébacées et de la partie supérieure des follicules pileux est importante. On constate l'absence de radioactivité dans le derme et dans l'hypoderme, que nous avons vu être dépourvu de pannicules adipeux. Il est possible de détecter une légère concentration radioactive dans le sang.

La répartition du *p*-cymène dans la peau du Lapin montre que, comme chez le Chien, l'hydrocarbure présente une forte affinité pour les lipides cutanés. On note toutefois deux différences : premièrement à l'inverse de celui du Chien, l'épiderme semble être traversé de manière directe par le *p*-cymène, car il est possible d'y détecter le carbone 14 ; deuxièmement, l'absence de graisses hypodermiques sous la peau empêche le stockage transitoire du composé marqué qui est entraîné directement dans l'organisme par le sang. Ces résultats confirment le rôle important joué par les glandes sébacées au cours de l'absorption percutanée mais ne précisent pas de manière nette l'importance de l'épiderme que nous allons maintenant essayer de montrer, en utilisant une peau dépourvue de follicules pileux.

IV. — ÉTUDE AUTORADIOGRAPHIQUE DE LA PÉNÉTRATION PERCUTANÉE DU P-CYMÈNE CHEZ LE RATON NOUVEAU-NÉ

Le choix de cet animal est justifié par l'absence d'appareils pilo-sébacés fonctionnels dans la peau.

Structure de la peau du raton

La peau de la Souris et du Raton nouveau-né a une structure caractérisée par l'absence de poils et la présence d'un épiderme stratifié épais et fortement kératinisé appelé *épitrichium* (HANSON, 1947). Cette structure disparaît au bout de trois à quatre jours à la pousse des premiers poils. Les follicules pileux et les glandes sébacées sont incomplètement développés et n'existent qu'à l'état de bourgeons qui ne semblent pas fonctionnels (fig. 10).

Nous avons pensé que cette structure particulière pourrait nous permettre de mettre en évidence le rôle de l'épiderme dans la pénétration percutanée.

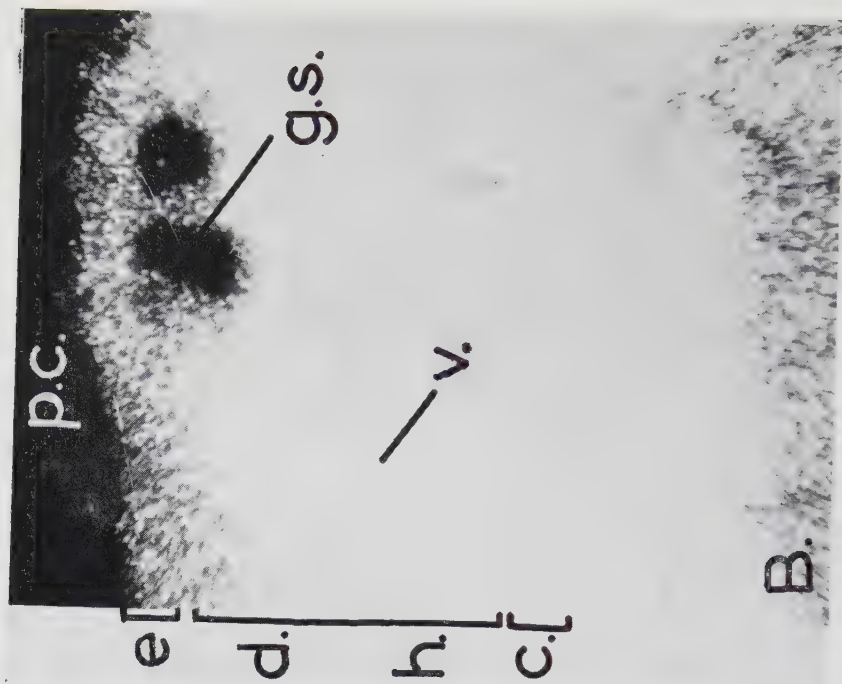
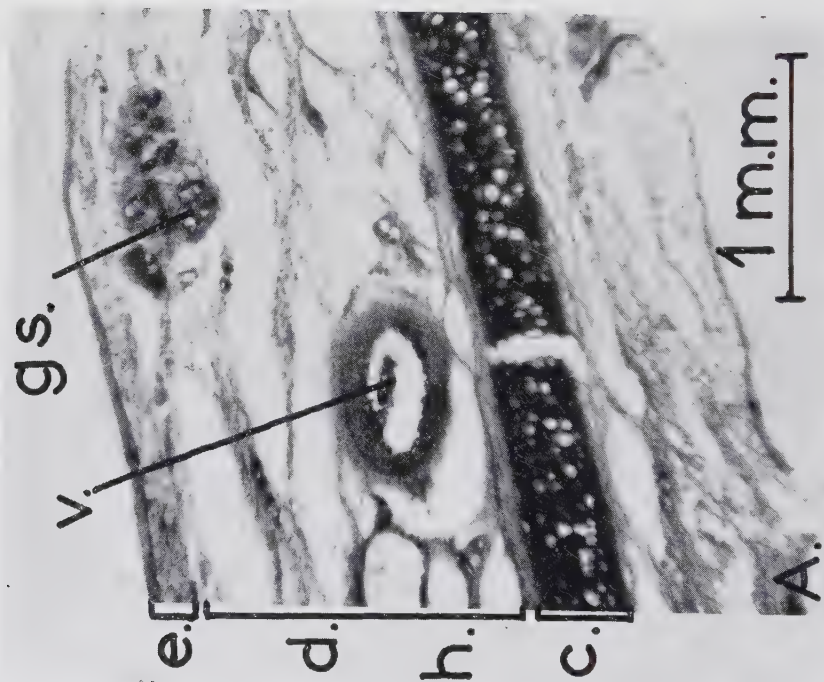


FIG. 9. — Coupe de la peau de l'oreille du Lapin (A) et autoradiographie correspondante. (B).
c : cartilage, *d* : derme, *e* : épiderme ; *gs* : glandes sébacées ; *h* : hypoderme ; *p.c.* : *p*-cymène en excès, *v* : vaisseau.

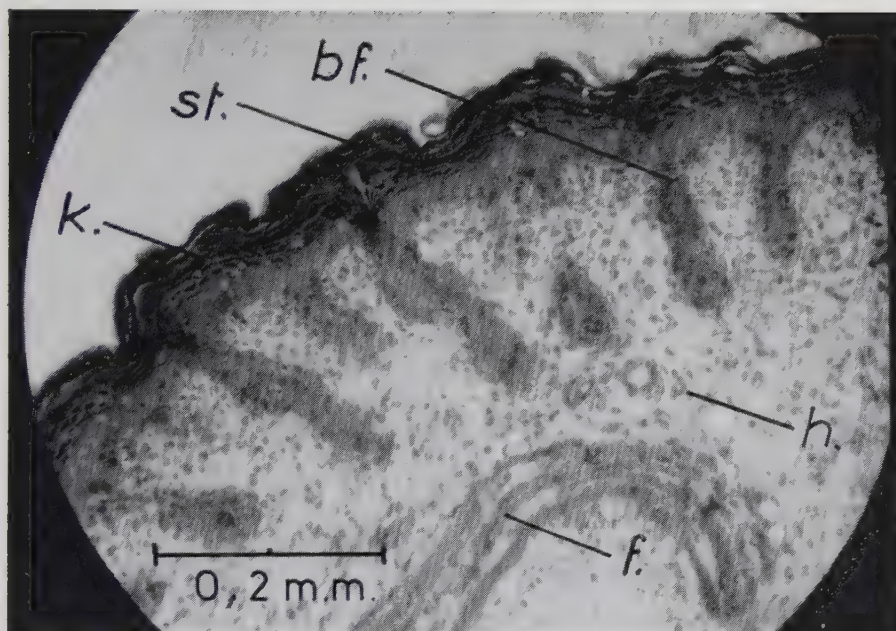


FIG. 10. — Coupe de peau de Raton.

bf : bourgeons pileux ; *f* : fibres musculaires ; *h* : hypoderme ; *k* : kératohyaline ; *st* : stratum corneum.

Avant d'aborder ce travail, nous avons voulu apprécier l'activité physiologique de la peau du Raton en étudiant, comme l'ont fait LEBLOND, EVERETT et SIMMONS, (1957) avec la méthionine ^{35}S , sa capacité d'incorporer le soufre 35 administré sous forme de cystéine (1). Pour cela 6,4 μCi (0,8 mg) de cystéine ^{35}S sous un volume de 0,2 ml est injecté par voie intrapéritonéale à des Rats âgés de 24 à 48 heures dont le poids est compris entre 7 et 8 g. 9 heures après l'administration du composé marqué, les animaux au nombre de cinq sont sacrifiés, le peau du dos est prélevée, fixée dans le liquide de Bouin Hollande, puis incluse dans la paraffine. Sur des coupes de 5 à 7 μ , collées sur lames gélatinées et colorées à l'hémalun de MEYER, on étale à l'aide d'une spatule l'émulsion nucléaire Ilford K5 fondue à 50° C (DELSA et SOTR, 1960). Après huit à quinze jours d'exposition, les plaques sont révélées à 14° C dans un révé-

(1) Nous avons contrôlé la pureté radiochimique de la cystéine ^{35}S par chromatographie ascendante sur papier Whatman n° 1 pendant quatre heures avec le solvant (butanol : 2, acide acétique : 1, eau : 1). Les autoradiographies des chromatogrammes comparées à des chromatographies de témoins inactifs, montrent la présence de cystéine dans une proportion supérieure à 95 p. 100 et permet de détecter des traces de cystéine ^{35}S .

laleur neutre à l'amidol, puis fixées dans une solution d'hyposulfite de sodium à 240 g par litre.

L'observation des coupes au microscope, montre que le soufre 35 se localise de façon intense au niveau des poils en formation (fig. 11) dans certains bulbes pileux et très faiblement dans l'épiderme en cours de cornification. Ce phénomène indique que les futurs poils et les gaines qui les entourent, sont le siège de transformations importantes qui aboutissent à la formation accélérée des appareils

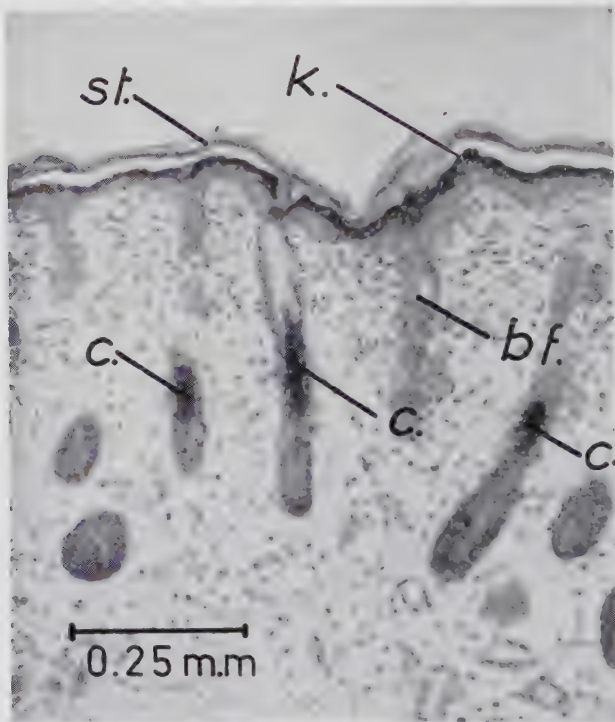


FIG. 11. — Autohistoradiographie montrant l'incorporation du soufre 35 de la cystéine dans la peau du Raton.

bf : bourgeons des follicules pileux, *c* : zones de concentration du soufre 35, *k* : kératohyaline (la kératohyaline est fortement colorée par l'hémalum), *st* : stratum corneum.

pilo-sébacés. Par contre l'épiderme fortement stratifié, utilise peu le soufre 35 et semble à l'état de repos, repos qui conduira à l'amincissement progressif de l'épiderme.

En conclusion, la peau du Raton a une structure transitoire, dans laquelle les follicules pileux subissent une différenciation accélérée et dont l'épiderme est en voie de régression. Pourtant chez le Rat de moins de trois jours, les formations kératinisées présentent encore une surface sans discontinuité dépourvue d'orifices pileux.

Il nous semble donc que cette structure est favorable pour analyser le rôle de l'épiderme dans l'absorption percutanée.

Technique

Le Raton est placé dans une boîte de contention identique mais de dimensions plus réduites que celle que nous avons décrite pour la Souris (p. 61). Sur la peau du dos des animaux, on dépose alors 0,05 ml de *p*-cymène à 200 $\mu\text{Ci/g}$ qui est laissé en contact pendant 30 minutes ou 1 heure, puis, après sacrifice par congélation dans l'azote liquide, les Rats sont débités au microtome à congélation selon notre technique d'autoradiographie. Les blocs et les coupes desséchées sont appliquées sur film kodirex monocouche ou Dentus rapid pendant quinze jours.

Les autoradiographies obtenues sont comparées aux coupes de référence à l'œil nu ou au microscope à contraste de phase sans coloration.

Résultats

Le contour de l'animal est impressionné par l'excès de *p*-cymène étalé à la surface de la peau. Dans l'organisme du Raton, l'hydrocarbure est décelé dans la graisse brune interscapulaire et dans le foie (fig. 12). On note sur les clichés obtenus à partir des coupes desséchées, la présence d'une faible quantité de métabolites dans la bile et dans la vessie.

La peau observée au microscope (fig. 13) permet de préciser la localisation du composé marqué sur la surface cutanée. Les couches

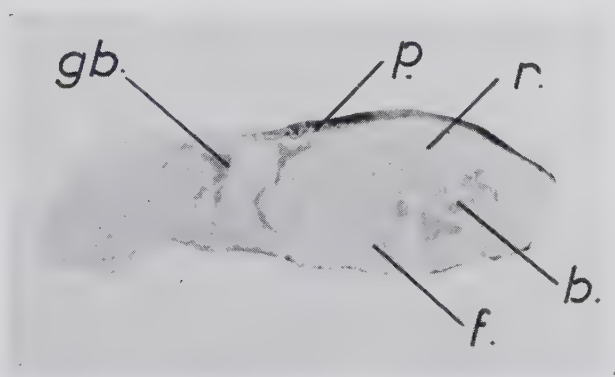


FIG. 12. — Autoradiographie de Raton après pénétration cutanée du *p*-cymène pendant 1 heure (aspect général).

b : bile ; *f* : foie ; *gb* : graisse brune interscapulaire ; *p* : peau ; *r* : rein.

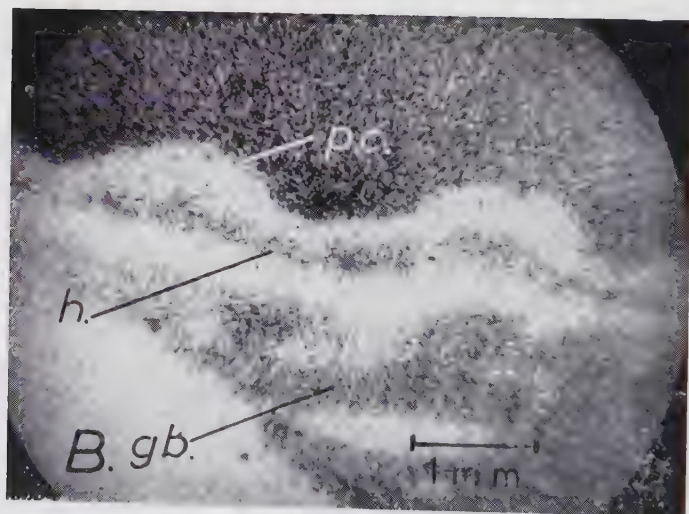
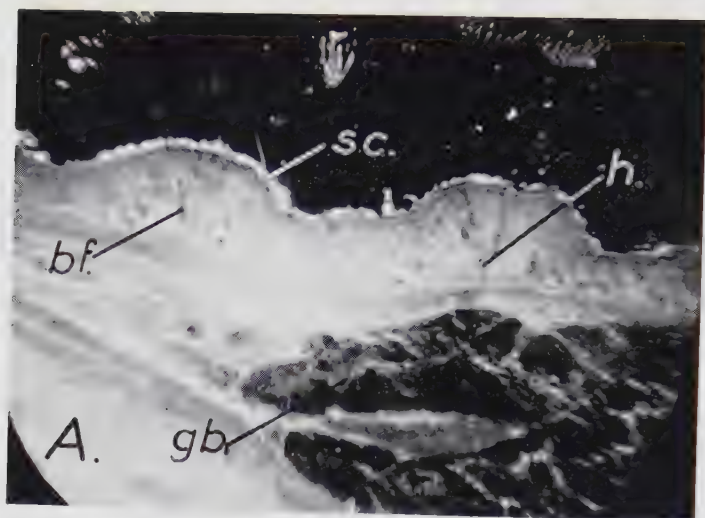


FIG. 13. — Coupe de peau de Rat nouveau-né (A) et autoradiographie correspondante (B) après application sur la peau du *p*-cymène ^{14}C pendant une heure (détail).
bf : bourgeons des follicules, pileux *gb* : graisse brune interscapulaire, *h* : hypoderme, *pc* : *p*-cymène en excès à la surface de la peau, *sc* : stratum corneum.

supérieures de l'épiderme sont dépourvues de radioactivité, par contre, une forte concentration radioactive est décelable à la base des futurs follicules pileux.

La localisation du *p*-cymène dans les organes du Raton prouve que l'hydrocarbure appliqué sur la peau traverse directement l'épiderme sans emprunter les voies pilo-sébacées en cours de différenciation, qui sont situées sous les assises épidermiques. Il faut noter cependant, comme nous l'avons vu, que la couche cornée est différente de celle de l'animal adulte. En effet, cette zone épaisse chez le Raton se réduit à quelques couches cellulaires chez le Rat plus âgé, et il nous semble que cette régression est déjà commencée puisque l'épiderme n'incorpore pas le soufre de la cystéine. De plus, HANSON (1947) arrive difficilement à distinguer par les techniques d'histologie les liaisons entre les cellules du *stratum corneum*, alors que celles-ci sont très nettes dans la peau de l'animal adulte.

On décèle la présence du *p*-cymène dans l'hypoderme au niveau des bourgeons des futurs follicules pileux, mais la localisation trop imprécise et la comparaison avec nos précédents résultats, nous empêche d'attribuer avec certitude à l'une ou l'autre de ces structures la rétention du carbone 14. En effet, premièrement, la concentration dans les bulbes pileux nous conduit à supposer que ceux-ci jouent un rôle particulier dans la pénétration, mais nous n'avons pas décelé ce phénomène chez le Chien, deuxièmement, l'absence de glycérides colorables par le Soudan III dans l'hypoderme du Raton nous amène à penser que des lipoprotéines fixent le composé marqué, à moins que les futures cellules adipeuses aient dès leur formation une affinité pour toutes les substances lipophiles.

IV. — DISCUSSION DES RÉSULTATS OBTENUS PAR AUTORADIOGRAPHIE

Cette étude a permis d'apporter une preuve directe de la pénétration dans l'organisme du *p*-cymène appliqué sur la peau. Chez la Souris, l'absorption de cette substance lipophile est rapide, la radioactivité étant décelable dès la quinzième minute.

Nous avons constaté que la traversée cutanée s'accompagne de phénomènes d'intoxication pour des temps de contact égaux ou supérieurs à 3 heures. La toxicité du benzène et de ses homologues a été rapportée par CHASSEVANT et GARNIER (1903) qui ont trouvé que le *p*-cymène administré par voie intra-péritonéale entraîne la mort du cobaye pour des doses de 2,162 g/kg de poids corporel. Ce chiffre peut être considéré comme un ordre de grandeur très approximatif de la quantité absorbée par la Souris exposée plus de trois heures au composé marqué. Des réactions locales se produisent également avec formation d'un érythème par irritation de la peau qui est délipidée et desséchée (GERARDE, 1960). Ce phénomène est

une propriété assez générale des solvants, puisque le chloroforme, le tétrachlorure de carbone, le dichlorométhane et le cyclohexane ont une action analogue sur la peau du Rat (SCHUTZ, 1960). Il semble donc que les solvants ne respectent pas totalement l'intégrité du revêtement cutané. Malgré cette restriction, nous avons analysé les rôles respectifs des appareils pilo-sébacés et de l'épiderme au cours de la traversée de la peau par le *p*-cymène.

Le follicule pileux et ses annexes sont des zones de passage du *p*-cymène, comme l'atteste la forte concentration de l'hydrocarbure dans la partie supérieure de la gaine des poils et dans les glandes sébacées. Ces régions riches en lipides se comportent comme un réservoir qui maintient une forte concentration de solvant au niveau des parois peu épaisses des appareils pilo-sébacés. Ces particularités réalisent des conditions très favorables à la pénétration.

Nos résultats confirment les expériences de JOACHIMOGLU (1924) et VALETTE, CAVIER, TRUHAUT et RUCARD (1956) qui ont mis en évidence avec les solvants chlorés une localisation analogue.

L'importance de l'épiderme dans l'absorption est démontrée chez le Raton nouveau-né, mais la structure particulière du revêtement cutané de cet animal ne permet pas de généraliser notre constatation. Pourtant, il semble également que l'épiderme du Lapin soit directement traversé. Ces faits peuvent être rapprochés des travaux effectués à l'aide d'hydrocortisone ^{14}C (SCOTT et KALZ, 1956), d'isopropylméthyl-fluorophosphate ^{32}P (BLANK, GRIESEMER et GOULD, 1958) et de tributylphosphate ^{32}P (TREGGAR, 1961) qui ont permis de conclure que la pénétration de ces substances se faisait à la fois par les follicules pileux et par l'épiderme. Dans le cas du *p*-cymène, on peut penser que la couche cornée fortement chargée de lipides s'imprègne de l'hydrocarbure et favorise une absorption ultérieure en maintenant un fort gradient de concentration au-dessus des barrières sous jacentes. Ce gradient reste élevé, car le composé entraîné par le sang est fixé dans les formations graisseuses de l'hypoderme et du reste de l'organisme. Enfin, la faible teneur en lipides (MONTAGNA, 1962) et la riche vascularisation du derme peuvent expliquer l'absence de radioactivité dans cette région.

La traversée cutanée du composé marqué s'effectue probablement sans transformation chimique, chez le Chien et le Lapin puisque, la radioactivité décelée dans la peau est entièrement volatile, alors que chez la Souris et le Raton la dégradation de l'hydrocarbure par l'ensemble de l'organisme ne permet pas une telle observation.

Les résultats obtenus montrent que les modalités de la pénétration sont propres à chaque structure cutanée et qu'il faut éviter dans l'interprétation des phénomènes étudiés une généralisation trop hâtive.

* * *

En résumé, l'étude autoradiographique de l'absorption percutanée du *p*-cymène chez différentes espèces animales a permis de loca-

liser, dans la peau du dos du Chien et la peau de l'oreille du Lapin, l'hydrocarbure au niveau des follicules pileux entre le poil et la gaine épithéliale externe jusqu'à la naissance de la gaine épithéliale interne, dans les glandes sébacées et leur conduit excréteur. Dans le cas du Raton, le composé marqué traverse directement l'épiderme et se concentre dans l'hypoderme au niveau des futurs follicules pileux.

Le *p*-cymène par suite de sa grande affinité pour les lipides cutanés, se montre capable de s'insinuer à travers les formations lipidiques des appareils pilo-sébacés et des cellules de la couche cornée, il atteint ainsi les cellules vivantes ou s'effectue le passage dans le milieu intérieur. Ce dernier fait est prouvé par la radioactivité présente dans l'organisme de la Souris et du Raton.

CHAPITRE V

ÉTUDE COMPARÉE DU PASSAGE DU *P*-CYMÈNE A TRAVERS LA PEAU ET D'AUTRES BARRIÈRES PHYSIOLOGIQUES

Afin de rechercher les facteurs communs qui règlent la pénétration des substances lipophiles à travers les membranes vivantes, nous avons comparé qualitativement l'absorption du *p*-cymène à travers la peau et la pénétration à travers l'épithélium pulmonaire, la barrière hématoencéphalique et la barrière placentaire chez la Souris et le Rat.

Cette étude n'a pu être abordée qu'après analyse du métabolisme du *p*-cymène, en effet, la dégradation de l'hydrocarbure conduit à des métabolites non volatils, dont la radioactivité se superpose à celle du *p*-cymène et empêche sa localisation précise.

Pour éviter ces inconvénients nous avons adopté un mode d'administration qui aboutit à une résorption immédiate du produit en opérant selon le principe qui suit : le *p*-cymène vaporisé est inhalé pendant 10 minutes par les animaux. Si le sacrifice est immédiat, il est possible de localiser par autoradiographie l'hydrocarbure avant le début de son métabolisme et d'analyser le rôle des membranes qui s'opposent à son passage. Si le sacrifice est retardé, on peut suivre la dégradation du composé marqué et l'élimination de la radioactivité.

Technique

1) APPAREILLAGE : APPAREIL DE CONTENTION POUR L'ÉTUDE DE LA PÉNÉTRATION PULMONAIRE DU *P*-CYMÈNE CHEZ LA SOURIS OU LE RAT.

De dimension variable suivant qu'il est destiné à la Souris ou au Rat, cet appareil est un tube à double paroi (fig. 14) dans laquelle circule un courant d'air chargé de vapeurs de *p*-cymène. L'animal est introduit à l'intérieur du tube, dont la paroi interne a son fond percé d'une ouverture permettant uniquement le passage des naseaux de l'animal qui respire ainsi de l'air chargé de l'hydrocar-

bure. L'entraînement des vapeurs de *p*-cymène est obtenu par barbotage à travers une faible quantité du composé marqué placé dans un petit réservoir latéral chauffé de façon discontinue à 100° C. Le courant gazeux est créé par l'aspiration d'une trompe à eau et réglé par un robinet à pointeau.

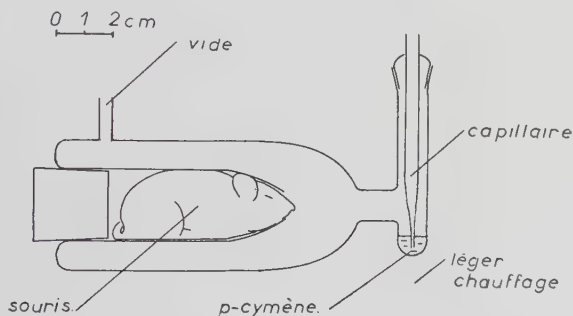


FIG. 14. — Schéma de l'appareil destiné à l'administration du *p*-cymène par voie pulmonaire à la Souris.

Après son passage dans l'appareil, par un souci de protection vis-à-vis de la contamination radioactive, l'air respiré est débarrassé des vapeurs d'hydrocarbure par capture dans de l'acide sulfurique concentré (D : 1,8).

2) ADMINISTRATION PULMONAIRE A LA SOURIS.

Des Souris d'un poids moyen de 20 g sont placées dans l'appareil de contention.

Dans une première série d'expériences, 10 animaux sont tués par immersion dans l'azote liquide immédiatement après une exposition de 2 minutes, 5 minutes et 10 minutes aux vapeurs de l'hydrocarbure d'une activité de 200 $\mu\text{Ci/g}$.

Dans une seconde série d'expériences, après une exposition de 10 minutes, le sacrifice est effectué au bout de temps variables compris entre 15 minutes et 24 heures ; le nombre des animaux mis en expérience est consigné dans le tableau XII.

La radioactivité est décelée selon notre méthode d'autoradiographie, le carbone 14 total étant détecté sur les blocs congelés à -30°C , le carbone non volatil sur les coupes desséchées à -20°C . On distingue les aires de fixation de la molécule volatile et de ses dérivés fixes en se reportant à la coupe de référence.

3) ADMINISTRATION PULMONAIRE A LA SOURIS GRAVIDE.

Suivant le même processus opératoire, on administre par voie pulmonaire pendant 10 minutes les vapeurs de *p*-cymène à 200 $\mu\text{Ci/g}$ à 11 Souris arrivées au 17 ou 18^e jour de la gestation (la durée

moyenne de la gestation chez cet animal étant de 20 à 21 jours). Six animaux sont sacrifiés immédiatement, les cinq autres sont conservés pendant 4 heures, puis congelés dans l'azote liquide, le carbone 14 est localisé comme précédemment par autoradiographie.

4) ADMINISTRATION PULMONAIRE DU *p*-CYMÈNE AU RAT.

Dans le but de préciser la localisation du *p*-cymène dans le système nerveux, nous avons fait inhaler à 6 Rats pendant 10 minutes, les vapeurs de l'hydrocarbure à 200 μ Ci/g. Les animaux sont immédiatement décapités, les têtes sont refroidies dans l'azote liquide, puis débitées au microtome à congélation suivant le plan sagittal. Le *p*-cymène est mis en évidence par application des blocs sur du film Kodirex monocouche pendant deux semaines.

Résultats

— *Pénétration pulmonaire chez la Souris* (1). Le passage du *p*-cymène à travers les poumons de la Souris est extrêmement rapide, dès la deuxième minute, on peut déceler la pénétration dans l'organisme, l'imprégnation de l'animal croît en fonction du temps d'exposition aux vapeurs de *p*-cymène.

Les autoradiographies obtenues après inhalation de 2, 5, et 10 minutes ne diffèrent entre elles que par l'intensité du noircissement, lequel est dû à l'hydrocarbure comme l'indique la comparaison des figures 15 *a* et 15 *b* qui montrent l'absence de radioactivité fixe. Après 5 et 10 minutes le composé marqué est accumulé dans les voies nasales supérieures et dans les poumons, d'où il est très rapidement distribué dans l'organisme par le sang dont l'imprégnation est identique à celle des poumons. Il faut noter que par rapport aux autres organes, la concentration dans le sang est plus importante après 5 minutes qu'après 10 minutes.

Le *p*-cymène véhiculé se concentre dans les graisses du mésentère et de la peau, dans la graisse brune interscapulaire et le foie. Sa répartition dans le système nerveux est hétérogène, la substance blanche étant plus imprégnée que la substance grise ; le même phénomène se reproduit dans l'intestin grêle dont la tunique musculaire est plus faiblement radioactive que la paroi muqueuse.

L'hydrocarbure est peu abondant dans les reins et les muscles, absent de la bile et de l'urine.

La détermination de la densité optique (2) du noircissement

(1) Cette étude a été présentée en collaboration avec Messieurs G. VALETTE et Y. COHEN à l'Académie des Sciences *C. R. Acad. Sci.*, 1962, 255, p. 596-598.

(2) L'appareillage utilisé est le densitomètre MK 4B et le photomètre MND Mk5 de la BALDWIN instrument Co Ltd, DARTFORD, Kent, England.

observé sur les autoradiographies obtenues à partir des blocs congelés, permet en rapportant les mesures à la densité optique du sang prise comme unité, une comparaison chiffrée de la concentration du radioisotope dans les organes (ULLBERG, 1954). Les valeurs trouvées consignées dans le tableau XI précisent la description des images.

TABLEAU XI

Concentration du p-cymène dans les organes de la Souris après une inhalation de dix minutes

(Comparativement à la concentration sanguine prise égale à 100)

Organe	Concentration moyenne	Concentrations extrêmes
Sang	100	100
Graisse intestinale.....	650	500-850
Graisse brune interscapulaire ..	470	300-650
Foie	230	150-350
Cerveau (substance blanche) ..	170	145-190
Cerveau (substance grise)	58	50-70
Poumons	100	100
Muscles	15	10-20
Reins.....	65	45-70

Chez les animaux tués après une attente de 15 minutes à 24 heures, l'hydrocarbure subsiste dans les graisses pendant 4 heures (fig. 18 *a*). Dans le système nerveux la concentration observée est transitoire, elle disparaît 15 minutes après la fin de l'exposition aux vapeurs radioactives (fig. 16 *a*).

Il apparaît sur les coupes desséchées une radioactivité fixe décelable qui est due aux produits non volatils de la dégradation du *p*-cymène par l'organisme. Ces métabolites sont visibles 15 minutes après l'inhalation du composé marqué (fig. 16 *b*). Leur taux passe par un maximum vers la quatrième heure et décroît fortement après 8 heures. Ces dérivés sont complètement éliminés en 24 heures. On constate que les milieux ou organes les plus chargés au bout d'une heure sont le sang, le foie et la bile, les reins et la vessie (fig. 17 *b*). Après 4 heures les reins et l'urine sont les plus fortement radioactifs (fig. 18 *b*). La concentration dans le cerveau est uniforme et identique à celle des muscles.

L'élimination s'effectue par la bile, mais il semble que les matières fécales ne soient pas radioactives, il y aurait donc une réabsorption intestinale avec un cycle entérohépatique et un rejet définitif par l'urine.

Le tableau XII décrit brièvement les autoradiographies obtenues au cours du temps. Nous n'avons pas pu chiffrer le noircissement sur les coupes desséchées comme dans le cas précédent, car l'auto-absorption après déshydratation des coupes est variable d'un

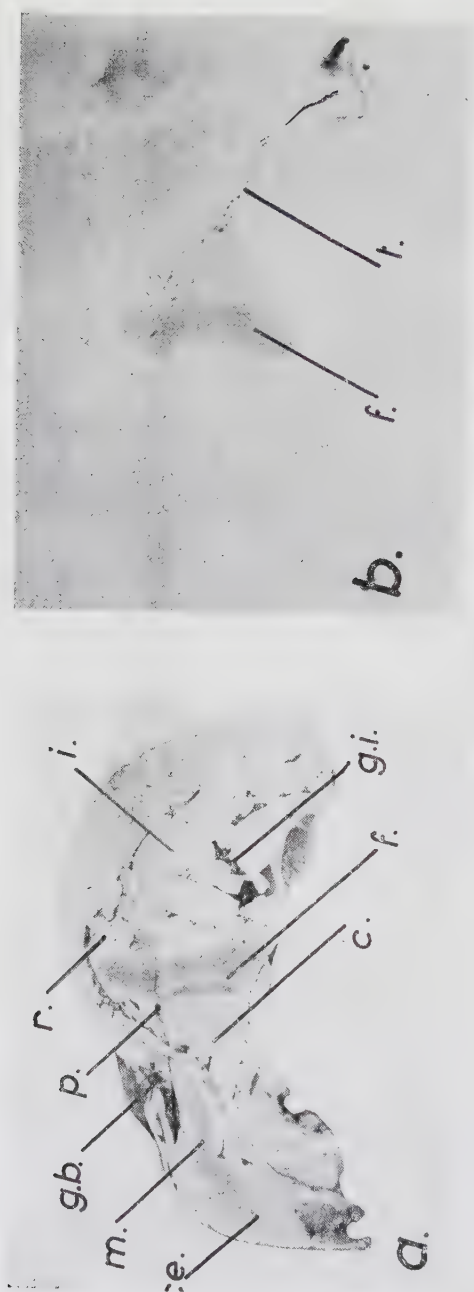


FIG. 15. — Sacrifice immédiat.

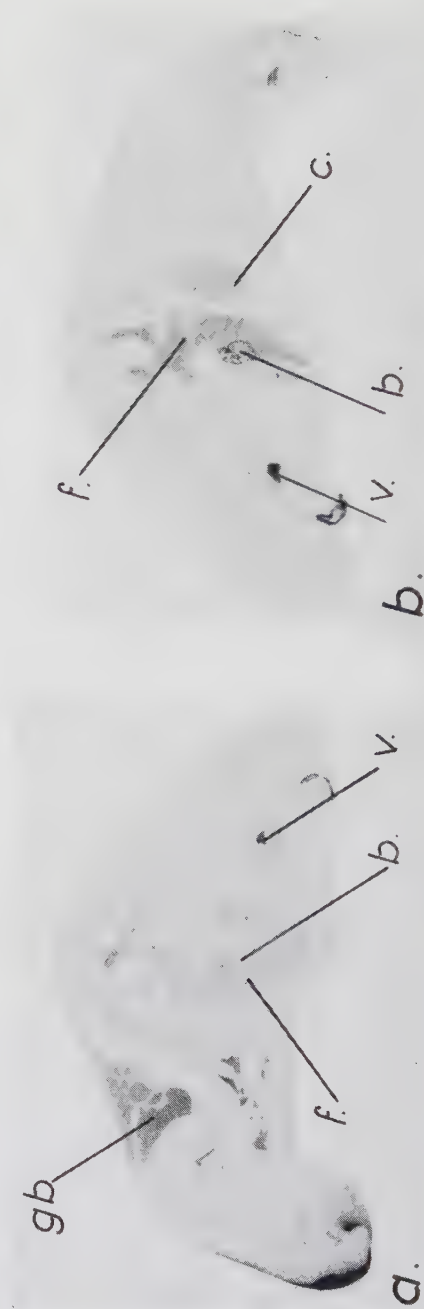


FIG. 16. — Sacrifice retardé de 15 mn.

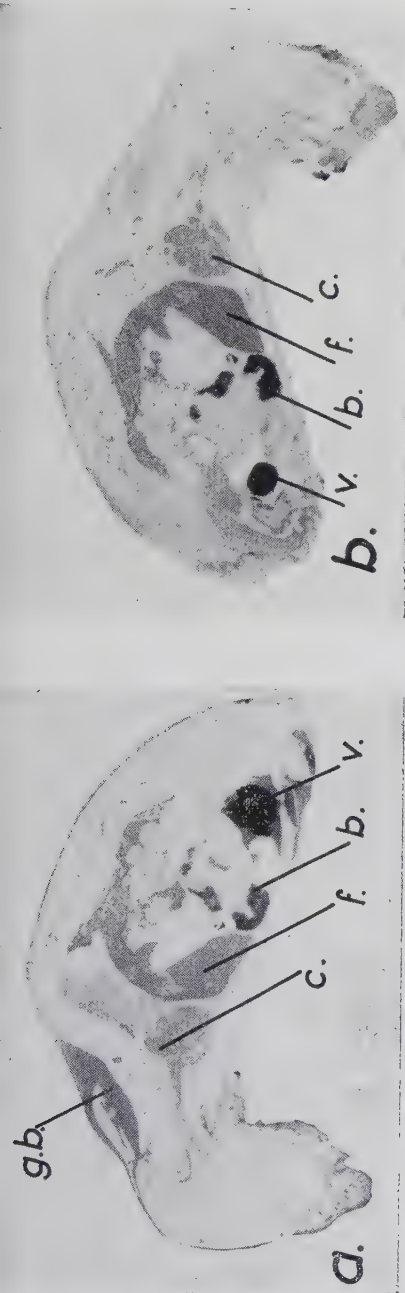


Fig. 17. — Sacrifice retardé de 1 h.

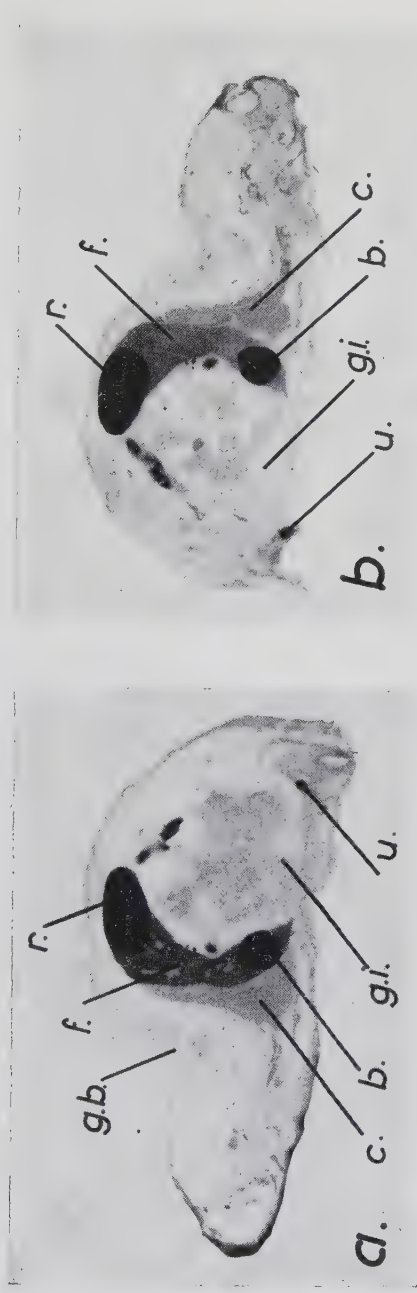


Fig. 18. — Sacrifice retardé de 4 h.

Autoradiographies de Souris entières après inhalation de *p*-cymène ^{14}C pendant 10 minutes.
 a) Radioactivité totale (fixe et volatile). b) Radioactivité fixe.
 b : bile, c : cœur, ce : cerveau, f : foie, gb : graisse brune interscapulaire, gr : graisse péritonéale,
 i : intestin, m : moelle, p : poumons, r : reins, t : trachée, u : urine, v : vessie.

organe à l'autre selon le pourcentage d'eau primitivement dans celui-ci ; ce phénomène fait disparaître la relation entre la densité optique de noircissement et la concentration en carbone 14.

TABLEAU XII

Répartition des métabolites du p-cymène dans les organes de la Souris

Durée de survie	Nombre d'animaux	Intensité du noircissement.			
		Nul ou très faible	Faible	Net	Intense
15 mn	2	muscles, cerveau, intestin, graisse	sang, rein, poumons	foie, bile, urine	
30 mn	2	muscles, cerveau, intestin, graisse	sang, rein, poumons	foie, bile	urine
1 heure	3	muscles, cerveau, intestin, fèces, graisse	sang, poumons	foie, rein	urine, bile
2 heures	2	muscles, cerveau, fèces, graisse	poumons, sang	foie, reins	urine, bile
4 heures	2	muscles, cerveau, graisses, fèces	sang, poumons	foie	rein, urine, bile
8 heures	2	fèces	foie	bile, urine	
24 heures	2	urine			

Pénétration pulmonaire chez la Souris gravide. La répartition du p-cymène chez les animaux sacrifiés aussitôt après l'exposition aux vapeurs radioactives, montre que chez la mère, la répartition du composé marqué est identique à celle observée chez les Souris normales (fig. 19 a). Les métabolites détectés après une survie de 4 heures suivent également les mêmes voies d'élimination.

Par contre dans les fœtus il est impossible de déceler la radioactivité volatile due au p-cymène, alors que les placentas sont légèrement imprégnés mais d'une façon moins intense que le sang. Après 4 heures de survie les métabolites ont envahi les fœtus et les placentas de façon homogène, la concentration radioactive est voisine de celle que l'on observe dans le sang de la mère (fig. 19 b).

Répartition du p-cymène dans le système nerveux du Rat. La pénétration de l'hydrocarbure dans le tissu nerveux est très rapide et, comme chez la Souris, la répartition est hétérogène (fig. 20). Les régions fortement myélinisées sont radioactives : moelle, bulbe, protubérance annulaire, substance blanche du cervelet et de l'encéphale. Par contre la substance grise est faiblement imprégnée.

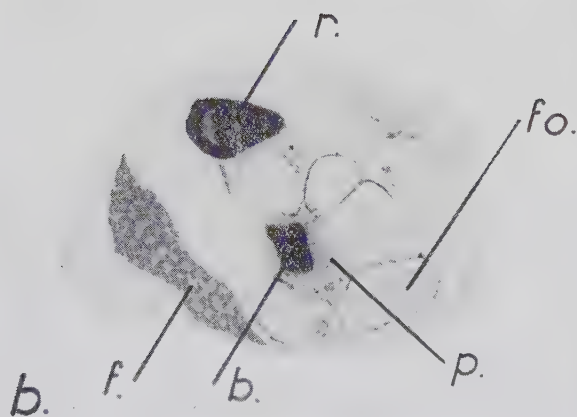
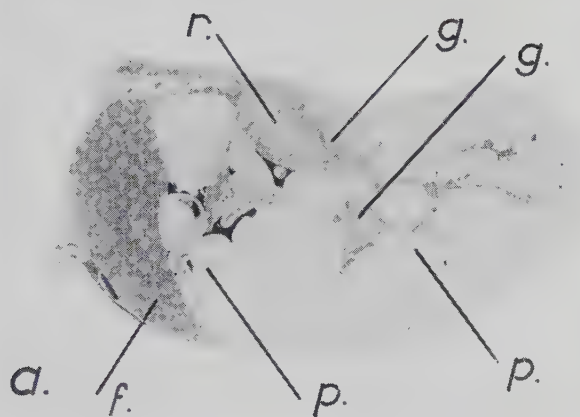


FIG. 19. — Autoradiographies de Souris gravides;
inhalation de *p*-cymène ^{14}C pendant 10 mn.

a) Sacrifice immédiat (radioactivité volatile).

b) Sacrifice retardé de 4 h (radioactivité fixe).

b : bile, *f* : foie, *fo* : foetus, *g* : graisse, *p* : placenta, *r* : rein.

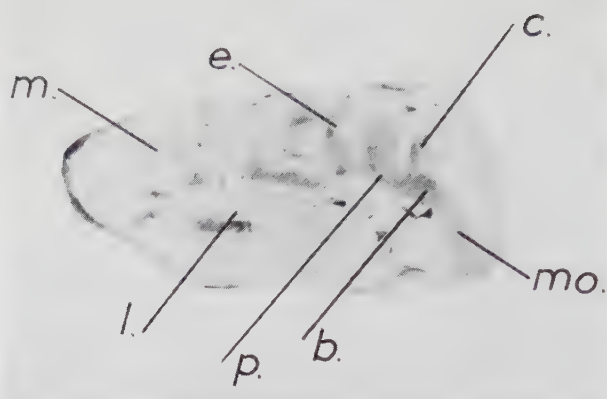


FIG. 20. — Autoradiographie d'une tête de Rat après inhalation de *p*-cymène pendant 10 mn, sacrifice immédiat.

b : bulbe, *c* : cervelet, *e* : encéphale, *l* : langue, *m* : museau, *mo* : moelle, *p* : protubérance.

Analyse des résultats

Nous analyserons successivement les résultats concernant la localisation et l'élimination de l'hydrocarbure, puis ceux qui mettent en évidence le rôle de différentes membranes dans la répartition de ce composé dans l'organisme.

LOCALISATION ET ÉLIMINATION DU *P*-CYMÈNE ET DE SES MÉTABOLITES

La distribution de l'hydrocarbure dans l'organisme de la Souris est presque instantanée. Elle s'effectue par voie sanguine comme l'atteste la forte radioactivité du sang qui est identique à celle du tissu pulmonaire.

L'intensité de l'imprégnation paraît liée à la teneur en lipides des organes, comme on peut le constater pour les graisses, la substance grise et la substance blanche du cerveau, les deux tuniques de l'intestin grêle et les muscles. En effet la teneur en lipides totaux de ces différents organes est de plus en plus faible, la concentration du *p*-cymène y est de moins en moins élevée (DEUEL, 1951, SPECTOR, 1956). Les graisses se comportent donc comme un tissu de stockage.

Le foie, dont la radioactivité est plus élevée que ne le laisse supposer sa richesse en lipides joue probablement un rôle particulier que nous nous proposons d'analyser ultérieurement.

Le *p*-cymène est rapidement dégradé en dérivés non volatils qui apparaissent en premier dans le tissu hépatique et sont excrétés par la bile, mais ils subissent une réabsorption totale par la muqueuse intestinale, puis sont enfin éliminés par l'urine. Ce phénomène montre la présence d'un cycle entérohépatique que nous essayerons de confirmer par l'étude de l'élimination urinaire, fécale et pulmonaire du *p*-cymène et de ses métabolites.

PÉNÉTRATION A TRAVERS DIFFÉRENTES MEMBRANES

Nous tenterons de dégager les différences et les facteurs communs qui règlent la pénétration à travers les poumons, le placenta et la barrière hémato-encéphalique en les comparant à l'absorption percutanée.

Paroi pulmonaire. La traversée pulmonaire procède sans doute d'un phénomène de diffusion extrêmement rapide, favorisé par la minceur de la membrane alvéolaire et par la grande surface de l'épithélium pulmonaire ; de plus, l'intensité de la circulation et la capacité de transport du sang qui semble importante, facilite l'absorption. Cette capacité est entretenue grâce à la fixation au niveau des lipides et du foie de l'hydrocarbure qui est éliminé de la circulation, cela maintient ainsi un gradient de concentration élevé entre les poumons et le sang.

Barrière placentaire. Le placenta de la Souris est comme chez l'Homme du type hémochorial, c'est-à-dire que le trophoblaste détruit presque toute la muqueuse utérine adjacente y compris les vaisseaux maternels. Les villosités fœtales baignent directement dans le sang maternel. Mais contrairement à celui de l'Homme le placenta de ce rongeur est du type labyrinthique (réseau) au lieu d'être du type vilieux (villosités) (SNOECK, 1958).

En 10 minutes le *p*-cymène ne traverse pas de manière visible ces différentes formations puisqu'il est absent des fœtus, bien qu'il soit décelable dans les placentas.

Ces constatations sont explicables par le fait que les composés liposolubles pénètrent moins rapidement à travers le placenta que les gaz et les substances hydrosolubles (COHEN, 1961 *a*). La vitesse de diffusion est également ralentie, car le passage dans les fœtus nécessite la traversée de plusieurs surfaces d'échange, situées entre le sang maternel et les villosités, les villosités et le sang du fœtus, le sang du fœtus et les organes du fœtus, qui conduisent à l'existence d'un gradient de concentration faible entre ces différents compartiments.

Un passage lent n'est pourtant pas exclu, puisque les métabolites sont retrouvés dans les fœtus, mais il est difficile de dire s'ils proviennent du métabolisme du *p*-cymène par le fœtus ou de la traversée du placenta par les métabolites.

Barrière hématoencéphalique. Cette zone s'oppose au passage de nombreuses substances (DOBBING, 1961) mais elle n'a pas d'existence anatomique précise. Elle se comporte dans certains cas comme une membrane lipodique (BRODIE, KURZ et SCHANKER, 1960), mais le plus souvent, elle est douée d'une sélectivité vis-à-vis des constituants de l'organisme ou même, on peut mettre en évidence à son niveau des phénomènes de transport actif (PAPPENHEIMER, HEISEY et JORDAN, 1961).

Le *p*-cymène franchit aisément cet obstacle. On peut penser que la traversée est favorisée par la forte proportion de lipides dans la substance nerveuse qui captent l'hydrocarbure au fur et à mesure de son absorption. Il existe ainsi un fort gradient de concentration entre le sang et le cerveau. Dès que l'inhalation du composé marqué est arrêtée, ce gradient disparaît et on assiste au passage en sens inverse ; en effet, l'hydrocarbure disparaît du système nerveux en moins de 15 minutes. Ces faits conduisent à admettre que la barrière hémato-encéphalique se comporte vis-à-vis du *p*-cymène comme une membrane de diffusion inerte, assimilable à une membrane de nature lipodique très perméable aux substances liposolubles (BRODIE, KURZ et SHANKER, 1960). Néanmoins la liposolubilité n'est pas seule en cause : le glucose, hydrosoluble traverse facilement cette membrane (LASSEN, 1959), le phénobarbital se répartit de façon inverse dans l'encéphale du Chat, la substance grise étant plus chargée que la substance blanche (DOMEK, BARLOW et ROTH, 1960). Enfin on peut remarquer que la répartition de la Méthaqualone (1) chez la Souris est homogène et transitoire (COHEN, BOISSIER et FONT DU PICART, 1962).

La comparaison de la pénétration à travers la peau, la paroi pulmonaire, la barrière placentaire et la barrière hématoencéphalique permet de mettre en évidence un phénomène commun qui est le passage du *p*-cymène à travers les capillaires, du sang dans les organes. Cette phase ultime de l'absorption est importante, car elle restitue au sang sa capacité de fixer l'hydrocarbure.

Il est possible de rapprocher les barrières pulmonaire et hématoencéphalique. En effet, on peut les considérer comme constituées par une membrane de diffusion très fine (paroi alvéolaire et capillaire pour les poumons, parois capillaire et hématoencéphalique pour le cerveau) qui sépare deux compartiments. La vitesse de diffusion importante dans les deux cas, dépend du gradient de concentration entre les faces de la paroi. Ce gradient est plus élevé dans le cas des poumons que dans le cas de l'encéphale.

De même, la comparaison de la peau et de la barrière placentaire, montre que, la résorption sanguine du *p*-cymène par l'animal ou le fœtus, est précédée de la traversée de plusieurs membranes qui aboutissent à la création d'un faible gradient de concentration entre les compartiments ainsi réalisés. Pour la peau, la substance après la traversée de l'épiderme se distribue dans le derme avant

(1) Méthaqualone : Méthyl-2 orthotolyl-3 quinazolone 4.

d'être résorbée par le sang à travers la paroi capillaire. Pour le placenta, le *p*-cymène dissous dans le sang maternel traverse la paroi des villosités fœtales, puis il se répartit dans le tissu de celles-ci avant de pénétrer dans le sang du fœtus à travers les capillaires. Ces conditions sont défavorables à la pénétration, néanmoins, l'absorption cutanée est importante puisque le *p*-cymène appliqué sur la peau constitue le premier compartiment, alors que dans le cas du placenta celui-ci n'est formé que par une solution très diluée de l'hydrocarbure dans le sang maternel.

* * *

En résumé, le *p*-cymène administré par voie pulmonaire à la Souris est immédiatement résorbé par diffusion à travers la paroi alvéolaire, il est distribué dans l'organisme par le sang. Le composé marqué se concentre dans le foie et les tissus riches en lipides, il est dégradé en produits non volatils, excrété par la bile, mais entièrement réabsorbé par l'intestin pour être enfin éliminé par l'urine.

L'hydrocarbure se montre capable de traverser la barrière hématoencéphalique, il se concentre dans la substance blanche. Par contre le placenta est imperméable au *p*-cymène, bien que les métabolites de ce dernier soient présents dans le fœtus.

La comparaison de la perméabilité de la peau, de la paroi pulmonaire, de la barrière hématoencéphalique et de la barrière placentaire incite à penser que la traversée du *p*-cymène se fait par diffusion, la vitesse de la pénétration étant fonction de l'épaisseur ou du nombre de membranes rencontrées et du gradient de concentration entre celles-ci.

Nous avons pu rapprocher d'une part, les modalités de la pénétration à travers les poumons et la barrière hématoencéphalique et d'autre part, les processus de l'absorption percutanée et de la traversée placentaire.

Cette étude nous suggère enfin, que l'élimination du *p*-cymène se fait exclusivement par voie urinaire. Cette supposition sera d'ailleurs examinée dans un prochain chapitre dans le dessein d'apprécier quantitativement la pénétration cutanée de l'hydrocarbure.

CHAPITRE VI

COMPARAISON DE LA PÉNÉTRATION CUTANÉE DU *p*-CYMÈNE ET D'AUTRES SUBSTANCES

Nous avons étudié chez la Souris, la pénétration cutanée de diverses substances lipophiles possédant des propriétés physico-chimiques différentes de celles du *p*-cymène, afin de mettre en évidence d'autres facteurs qui interviennent dans l'absorption. Nous avons également essayé de voir dans quelle mesure cet hydrocarbure facilitait la traversée percutanée des composés qui y sont dissous.

Trois substances marquées ont été utilisées : l'iode métalloïdique ^{131}I en solution dans l'eau ou dans le *p*-cymène, l'acide *p*-isopropylbenzoïque ^{14}C -7 dissous dans le *p*-cymène et le squalane tritié (hydrocarbure à 30 atomes de carbone, obtenu par hydrogénation du squalène dont la formule brute est $\text{C}_{30}\text{H}_{50}$) employé pur ou dilué dans le *p*-cymène.

Après application de ces produits sur la peau de la Souris ; on prépare selon la technique de COHEN et DELASSUE (1959) des autoradiographies à partir de coupes desséchées. La comparaison du noircissement obtenu sur des films, permet d'estimer grossièrement l'intensité de la pénétration.

Mode opératoire

Sur la peau du dos de Souris de 20 à 22 g, tondues aux ciseaux courbes et placées dans la boîte de contention décrite au chapitre IV (p. 61), on dépose 0,1 ml de la solution essayée. Après un temps de contact suffisant, les Souris sont tuées par congélation dans l'acétone refroidie à -78°C par de la neige carbonique (nous avons préféré ce mélange réfrigérant à l'azote liquide parce qu'il élimine l'excès de la substance déposée sur la peau). Des autoradiographies sont obtenues à partir de coupes sagittales desséchées de l'animal, selon la technique exposée au chapitre III.

Les modalités opératoires pour les trois substances sont les suivantes :

- 1) *Cas de l'iode*. Nous avons appliqué pendant 90 minutes,

d'une part, sur le dos de trois Souris, 0,1 ml d'une solution aqueuse iodo-iodurée neutre préparée de la façon suivante :

Iodate de potassium N/100	1 ml
Iodure de potassium à 0,5 p. 100.....	1 ml
Solution d'iodure de sodium ^{131}I à 15 mCi/ml	0,2 ml
Acide sulfurique N/10	0,2 ml
Carbonate acide de sodium N/5	0,1 ml

Cette solution contient 500 μg d'iode par millilitre et sa concentration radioactive est de 1,2 mCi/ml ; d'autre part, sur la peau de trois autres animaux, 0,1 ml d'une solution d'iode ^{131}I dans le *p*-cymène dont la teneur en métalloïde et la concentration radioactive sont identiques à celles de la solution précédente. Les deux expériences sont conduites simultanément pour être comparatives. Les coupes sont exposées sur film Kodirex monocouche pendant 7 jours.

2) *Cas de l'acide p-isopropylbenzoïque.* On dépose 0,1 ml, soit 8,5 μCi d'une solution d'acide *p*-isopropylbenzoïque ^{14}C -7 à 0,46 p. 100 dans le *p*-cymène sur la peau de Souris pendant une demi-heure, 1 heure et 2 heures. Le nombre des animaux pour ces temps respectifs étant de deux, trois et deux. La radio-activité est décelée sur les autoradiographies après 12 jours de contact.

3) *Cas du squalane.* Un dixième de millilitre de squalane tritié dont l'activité spécifique est de 0,235 Curie/g est appliqué sur la peau épilée de trois Souris pendant 1 heure et de cinq Souris pendant 2 heures. Dans un deuxième essai le squalane tritié dilué au demi dans du *p*-cymène est appliqué sur le dos de cinq animaux pendant 2 heures. Après sacrifice des Souris par congélation, les coupes déshydratées sont exposées sur le film radiographique un temps deux fois plus long dans le deuxième essai pour permettre une comparaison du noircissement des autoradiographies obtenues dans les deux expériences. Cette comparaison se fait par rapport à une gamme préparée en déposant sur des rondelles de papier filtre, 5 mm³ de dilutions successives de squalane dans du toluène titrant : 2350, 470, 235, 96, 47 et 10 $\mu\text{Ci/ml}$. La gamme est exposée sur le film en même temps que les coupes. Pour un noircissement identique, on peut considérer en première approximation que le papier-filtre desséché imprégné de la substance tritiée est assimilable à un tissu déshydraté, ayant avant dessiccation, la même concentration radioactive que la solution déposée sur le papier.

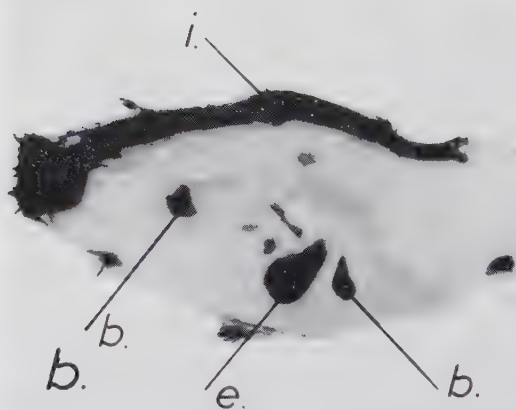


FIG. 21. — Autoradiographies de coupes de Souris entières après application d'iode ^{131}I sur la peau pendant 90 minutes.

a) iode en solution dans l'eau.

b) iode en solution dans le *p*-cymène.

b_{Δ} : bile, *e* : estomac, *i* : iode fixé à la surface de la peau, *r* : rein, *v* : vessie.

Résultats

L'absorption de l'iode par la peau s'accompagne d'une forte fixation du métalloïde sur les couches superficielles de l'épiderme, sans qu'il soit possible de localiser ce radioélément avec précision, par suite de la grande énergie de son rayonnement qui provoque un halo sur le film autour des zones de concentration. La vitesse de pénétration de l'iode, proportionnelle au noircissement des autoradiographies est plus importante lorsque la substance est appliquée en solution dans le *p*-cymène que lorsqu'elle est en solution aqueuse (fig. 21 *a* et 21 *b*).

L'acide *p*-isopropylbenzoïque, dissous dans le *p*-cymène, est résorbé avec rapidité par la peau, sa distribution dans l'organisme est assez diffuse par suite de la radioactivité importante du sang, mais sa concentration croît en fonction du temps d'exposition. L'acide est aussi abondant dans le sang que dans le foie et les reins au bout de une heure (fig. 22), après 2 heures le carbone 14 est concentré davantage dans les organes qui contribuent à l'élimination du composé, le foie et les reins et dans leurs produits d'excrétion, la bile et l'urine.

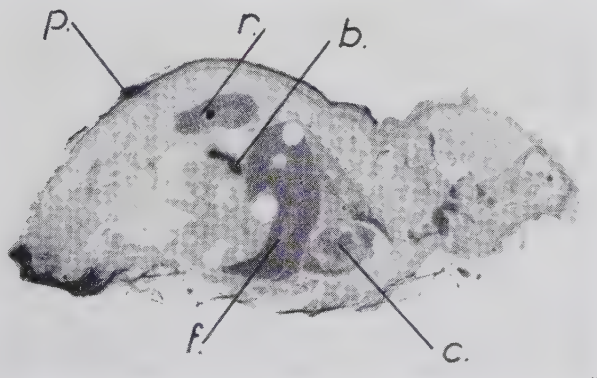


FIG. 22. — Autoradiographie de coupe de Souris après application sur la peau d'acide cuminique ^{14}C en solution dans le *p*-cymène pendant 1 h.

b : bile, *c* : cœur avec du sang, *f* : foie, *p* : peau au point d'application, *r* : rein.

Dans le cas du squalane tritié, après 2 heures d'application sur la peau, les autoradiographies obtenues sont très peu impressionnées, même pour un temps de contact prolongé des coupes sur le film (50 jours). Il est néanmoins possible de détecter une faible pénétration de la substance qui se concentre dans le foie, les reins et les poumons (fig. 23 *a*). Le noircissement de ces organes, comparé

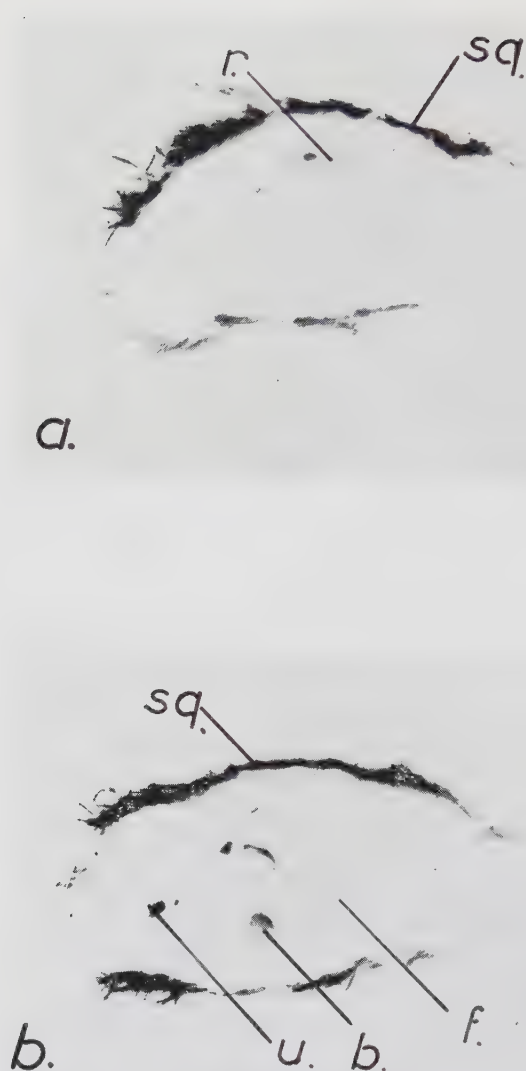


FIG. 23. - - Autoradiographies de coupes de Souris après administration percutanée de squalane tritié pendant deux heures.

a) Squalane pur.

b) Squalane dissous dans le *p*-cymène.

b : bile, *f* : foie, *sq* : excès de squalane à la surface de la peau, *r* : rein, *u* : urine.

à la gamme d'étalonnage préparée simultanément, permet d'estimer que la concentration du tritium dans ceux-ci est voisine de 20 $\mu\text{Ci/g}$ ce qui conduit pour une Souris de 20 g à une absorption de 400 μCi de squalane, soit moins de 2 p. 100 de la dose déposée sur la peau qui s'élevait à 23 500 μCi . L'addition de *p*-cymène au perhydrosqualène ne modifie pas de façon visible la vitesse de pénétration du composé tritié (fig. 23 b).

Les résultats obtenus montrent que :

1) La liposolubilité qui est une propriété commune à tous les composés étudiés, n'est pas le seul facteur qui conditionne la pénétration des substances chimiques à travers la peau. En effet, si l'introduction d'un groupement acide hydrophile sur la molécule de *p*-cymène qui conduit à l'acide *p*-isopropylbenzoïque ne modifie pas les propriétés pénétrantes, par contre, l'augmentation du poids moléculaire des hydrocarbures, dont le squalane est un exemple, est un obstacle à l'absorption. VALETTE, CAVIER et SAVEL (1954) ont constaté dans la série des hydrocarbures aliphatiques, une diminution de la capacité de pénétration avec l'allongement de la chaîne carbonée. Ces auteurs ont pu relier ce phénomène à un accroissement de la viscosité, qui est fonction du nombre d'atomes de carbone de la molécule et qui s'oppose à la diffusion des substances à travers la peau. Dans le cas du squalane, il semble que l'on puisse incriminer cette propriété, car la viscosité de ce dernier est élevée et égale à 6,08 °ENGLER à 20 °C. Nos résultats peuvent être rapprochés de ceux de CZETSCH-LINDEWALD (1943) qui a montré qu'un autre carbure très condensé, la vaseline ne traverse pas le revêtement cutané en quantité pondérable, car son application sur la peau ne s'accompagne pas de l'augmentation de l'insaponifiable de l'extrait chloroformique des tissus. Il faut noter que cette méthode est moins fine que celles qui font appel aux radioisotopes.

2) Le *p*-cymène utilisé comme véhicule des substances appliquées sur la peau favorise leur pénétration (VALETTE, HUERRE, 1957 ; VALETTE, HUERRE et ZIZINE, 1958). Nous retrouvons cette action dans le cas de l'iode. Par contre, l'absorption du squalane reste faible même en présence de l'hydrocarbure. Le *p*-cymène semble donc capable de favoriser la pénétration cutanée des substances absorbables, mais elle ne peut entraîner dans l'organisme les molécules non pénétrantes (VALETTE, 1954).

* * *

En conclusion, la perméabilité de la peau aux substances chimiques n'est pas sous la seule dépendance de la liposolubilité, mais encore de la viscosité. Il est également possible de modifier les propriétés pénétrantes d'une substance absorbable en la dissolvant dans le *p*-cymène.

TROISIÈME PARTIE

ÉTUDES QUANTITATIVES DE LA PERMÉABILITÉ CUTANÉE

L'analyse qualitative de la perméabilité cutanée nous a permis de comprendre le mécanisme de la première phase de la pénétration et de mettre en relief ses particularités par rapport aux autres membranes.

Pour mesurer la vitesse d'absorption et analyser la phase de résorption du *p*-cymène par le sang et la lymphe, nous avons été amenés au préalable, à rechercher par l'étude du métabolisme de l'hydrocarbure, les moyens de le doser après sa pénétration dans l'organisme de l'animal.

Nous étudierons tout d'abord, les processus de dégradation du *p*-cymène, puis, dans le chapitre suivant, nous analyserons le rôle de la lymphe et du sang dans la résorption du composé au niveau du derme ; enfin, nous traiterons de la mesure de l'absorption percutanée.

CHAPITRE VII

RÉSORPTION ET DÉGRADATION DU P-CYMÈNE

Nous avons vu que le *p*-cymène après pénétration dans l'organisme, subissait une dégradation sous forme de dérivés hydrosolubles éliminés par l'urine à la suite d'un cycle entérohépatique. Nous chercherons à confirmer et à compléter cette analyse par des déterminations quantitatives qui auront pour but de :

- Mesurer l'élimination urinaire et fécale.
- Mesurer la résorption et l'élimination pulmonaire.
- Rechercher les organes qui participent le plus activement à la dégradation du *p*-cymène.
- Essayer d'identifier les métabolites de l'hydrocarbure.

I. — RÉSORPTION PÉRITONÉALE ET ÉLIMINATION URINAIRE ET FÉCALE

Notre étude a porté en même temps sur l'élimination urinaire et fécale. Nous avons effectué, d'une part, chez la Souris, le dosage dans l'urine et les matières fécales de la radioactivité excrétée pendant les 24 heures qui suivent l'administration parentérale d'une solution huileuse de *p*-cymène ^{14}C et, d'autre part, chez la Souris et le Rat, la mesure de la radioactivité de l'urine jusqu'à élimination complète du carbone 14.

Technique

L'étude est conduite dans une cage à métabolisme simplifiée dérivée de celle décrite par ROTH, LEIFER, HOGNESS et LANGHAM, (1948). Cette cage est une cloche cylindroconique en verre épais, munie d'un couvercle en plexiglass pour permettre l'introduction de l'animal. Un grillage à larges mailles qui soutient la Souris ou le Rat, sépare la partie cylindrique du cône qui forme entonnoir

et dont l'ajustage (fig. 24) comporte un dispositif de séparation des matières fécales et de l'urine vers deux récipients. La nourriture et la boisson sont distribuées par un diverticule latéral et par un biberon.

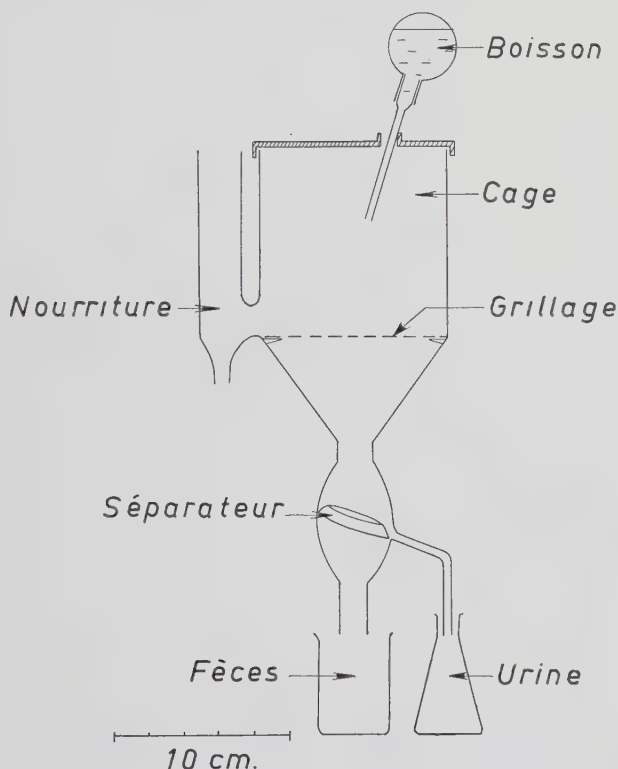


FIG. 24. — Schéma de la cage à métabolisme pour souris.

On administre par voie intrapéritonéale à des souris d'environ 20 g ou à des rats de 150 à 200 g, une quantité connue d'une solution de *p*-cymène à 10 p. 100 dans l'huile d'olive dont la concentration radioactive est mesurée à 5 p. 100 près. Les animaux sont placés individuellement dans la cage, puis conservés, soit pendant 24 heures afin de recueillir l'urine et les matières fécales, soit pendant 3 jours pour récolter les urines jusqu'à élimination totale du carbone 14 rejeté par cette voie.

Le volume urinaire est mesuré après nettoyage de la cage avec 2 à 3 ml d'eau distillée ; les fèces sont desséchées, pesées et pulvérisées au mortier.

La détermination de la concentration radioactive de 1 ml d'urine, selon le procédé que nous avons décrit (p. 48), permet de connaître la radioactivité et le pourcentage de carbone 14 éliminé par l'urine.

La radioactivité fécale est mesurée sur des échantillons de

carbonate de baryum préparés après minéralisation d'une fraction des fèces selon la technique de VAN SLYKE et FOLCH.

Différentes vérifications sont effectuées par autoradiographie pour contrôler sur les animaux conservés 24 heures, la répartition du carbone 14 le long de l'intestin et sur les Souris gardées 72 heures, l'absence de radioactivité résiduelle; enfin nous contrôlons sur ces mêmes rongeurs que les urines émises après trois jours ne sont plus radioactives.

Résultats

Bien que le transit intestinal de la Souris soit rapide, en 24 heures, la radioactivité éliminée par les matières fécales est négligeable et ne représente que 0,05 à 2 p. 100 de la dose injectée. Par contre, l'élimination urinaire sous forme de dérivés hydrosolubles est importante, puisque dans le même temps, elle entraîne de 22 à 42 p. 100 du carbone 14 administré (tableau XIII). Les

TABLEAU XIII

Elimination urinaire et fécale chez la Souris des métabolites du p-cymène en vingt-quatre heures

Animal N°	Activité injectée μCi	Elimination urinaire		Elimination fécale	
		en μCi	en %	en μCi	en %
1	6,97	2,2	31	0,025	0,05
2	8,95	3,8	42	0,18	2
3	10,5	3,12	30	0,033	0,3
4	12,5	2,55	22	0,012 5	0,1
5	6,3	1,6	26	0,019	0,25

autoradiographies confirment ces résultats, car elles sont dépourvues de noircissement au niveau des fèces. De plus, on retrouve dans l'urine de 72 heures la quasi-totalité du carbone 14 aux erreurs d'expériences près, soit 90 à 100 p. 100 et 89 à 95 p. 100 respectivement pour le Rat et la Souris (tableau XIV).

Ces résultats montrent également que la diffusion du p-cymène à partir du péritoine est lente. En effet, nous avons vu que l'élimination de l'hydrocarbure administré par voie pulmonaire est terminée en 8 heures. La faible élimination urinaire constatée après 24 heures est donc le fait d'une diffusion peu rapide au niveau du péritoine, comme le prouvent par ailleurs les autoradiographies obtenues à partir des Souris congelées, qui permettent de détecter une activité volatile importante au niveau du point d'injection.

TABLEAU XIV

Elimination urinaire chez le Rat et la Souris des métabolites du p-cymène en soixante-douze heures

N°	Volume injecté	Activité injectée	Volume d'urine	Activité retrouvée dans l'urine	% d'activité dans l'urine
Rat 1	1 ml	6 μ Ci	20 ml	5,5 μ Ci	92 p. 100
2	1 ml	6 μ Ci	20 ml	6 μ Ci	100 p. 100
3	1 ml	2 μ Ci	16 ml	1,8 μ Ci	90 p. 100
4	1 ml	2 μ Ci	12 ml	2 μ Ci	100 p. 100
Souris 1	0,2 ml	3,3 μ Ci	8,8 ml	2,95 μ Ci	89,5 p. 100
2	0,2 ml	3,3 μ Ci	7,8 ml	3 μ Ci	90 p. 100
3	0,2 ml	3,3 μ Ci	8,3 ml	3,15 μ Ci	95 p. 100
4	0,3 ml	4,95 μ Ci	15 ml	4,6 μ Ci	93 p. 100
5	0,3 ml	4,95 μ Ci	15 ml	4,5 μ Ci	91 p. 100
6	0,3 ml	4,95 μ Ci	15 ml	4,5 μ Ci	91 p. 100

II. — RÉSORPTION ET ÉLIMINATION PULMONAIRE DU P-CYMÈNE

Nous avons mesuré la vitesse de la résorption pulmonaire du *p*-cymène, afin de la comparer ultérieurement à l'absorption percutanée. De plus comme les substances volatiles sont souvent éliminées partiellement par voie pulmonaire, nous avons apprécié, l'importance de cette élimination dans le cas du *p*-cymène, car cette dernière pouvait représenter une fraction de la radioactivité non retrouvée dans l'urine. Enfin nous avons recherché la présence du gaz carbonique ^{14}C dans l'air expiré, afin de contrôler l'absence de dégradation de la molécule marquée dans l'organisme animal jusqu'au stade de CO_2 .

a) Résorption pulmonaire

Après administration du *p*-cymène par voie pulmonaire à la Souris, la quantité d'hydrocarbure résorbée à travers les poumons est déterminée en mesurant la radioactivité de l'urine qui contribue pour plus de 90 p. 100 à l'élimination du carbone 14.

Technique

Neuf Souris de 20 à 22 g sont installées dans l'appareil que nous avons décrit plus haut (chapitre V p. 77). Elles inhalent pendant 2, 5, ou 10 minutes, les vapeurs de l'hydrocarbure à 200 $\mu\text{Ci/g}$.

Après ce traitement, elles sont placées individuellement pendant 3 jours dans la cage à métabolisme utilisée au paragraphe précédent. La radioactivité de l'urine recueillie, exprimée en poids de *p*-cymène, permet d'apprécier le taux de résorption pulmonaire.

Résultats

La quantité de *p*-cymène inhalée par la Souris est importante, elle passe d'environ un mg en une minute à 3 et 4 mg en 5 et 10 minutes (tableau XV),

TABLEAU XV
p-cymène inhalé par la Souris en fonction du temps
(Activité spécifique 200 μ Ci/g)

Souris No	Temps d'exposition en mn	Radioactivité des urines de 72 h. en μ Ci	<i>p</i> -cymène inhalé en mg
1	2	0,13	0,65
2	2	0,26	1,3
3	5	0,66	3,3
4	5	0,62	3,1
5	5	0,62	3,1
6	10	0,91	4,55
7	10	0,90	4,5
8	10	0,64	3,2
9	10	0,84	4,2

b) Elimination pulmonaire du *p*-cymène

Afin, d'une part, de séparer l'hydrocarbure du gaz carbonique éliminé par les poumons et d'autre part, d'éviter que le *p*-cymène qui peut ressortir du point d'inoculation soit compté avec le composé marqué éliminé par les poumons, nous avons adopté la méthode décrite ci-dessous : un courant d'air décarbonaté, obtenu par l'aspiration d'une trompe à eau, pénètre dans une enceinte en relation avec les naseaux de l'animal, puis en ressort en passant à travers un mélange sulfonant qui capte le *p*-cymène et une solution d'hydroxyde de sodium qui recueille le gaz carbonique.

Technique

Nous décrirons successivement l'appareil et le mode opératoire.

DESCRIPTION DE L'APPAREIL

Le montage comprend quatre éléments (fig. 25) :

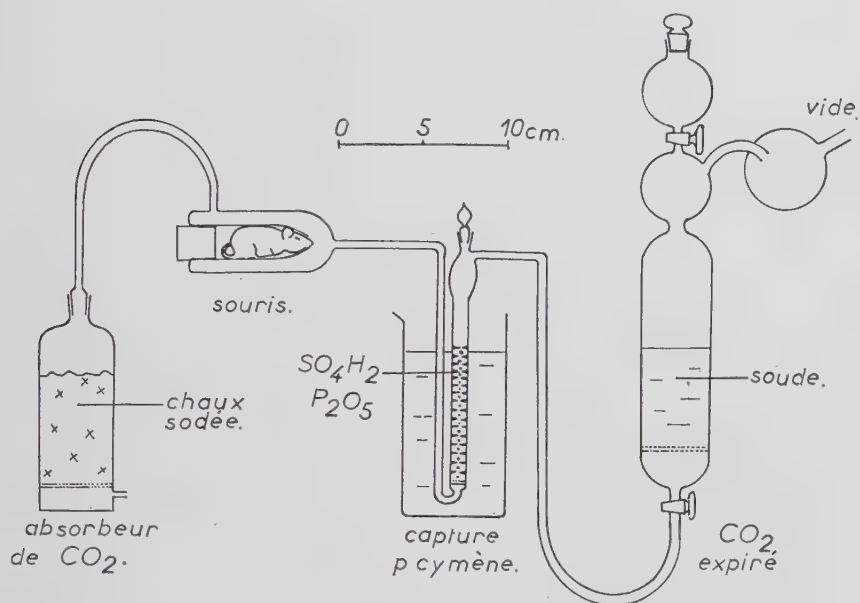


FIG. 25. — Schéma de l'appareil destiné à l'étude de l'élimination pulmonaire du *p*-cymène.

— Un absorbeur de gaz carbonique atmosphérique rempli de chaux sodée qui permet d'obtenir de l'air décarbonaté.

— Un appareil de contention voisin de celui décrit à propos de l'administration pulmonaire du *p*-cymène, qui ne laisse que les narines de l'animal en contact avec le courant d'air.

— Un barboteur à pointes de Vigreux.

— Un barboteur constitué par une allonge qui peut être traversée de bas en haut par un courant d'air fractionné à travers un verre fritté n° 4 (1).

Une régulation de débit d'air constituée par un débitmètre capillaire placé à l'entrée de l'appareil et une valve à mercure disposée en dérivation, permettent de régler la vitesse de passage de l'air à travers le dispositif.

(1) Cet élément a été emprunté à l'appareil à métabolisme dont Madame DAUDEL nous a fourni le schéma. Nous lui présentons ici nos vifs remerciements.

MODE OPÉRATOIRE

Le flacon absorbeur de gaz carbonique est rempli de chaux sodée. Dans le barboteur de Vigreux placé au bain-marie bouillant, on verse 7 ml du mélange sulfonant dont nous avons précisé la composition et les modalités d'emploi au chapitre III (p. 44). Le robinet inférieur du deuxième barboteur étant ouvert, l'appareil est mis en route en branchant la trompe à eau. La dépression est réglée à l'aide du débitmètre capillaire, de façon qu'elle soit voisine de 1 cm de mercure (la valve à mercure est réglée pour se désamorcer lorsque la dépression atteint 3 cm de mercure). On introduit par le robinet supérieur, aussitôt refermé, de ce barboteur, une solution normale de soude dont le volume est fonction de la durée de l'expérience, à raison de 25 ml par heure. La Souris est introduite dans le tube de contention pendant 4 à 6 heures, après lui avoir administré par voie intrapéritonéale 0,20 ou 0,25 ml d'une solution huileuse de *p*-cymène à 10 p. 100 dont l'activité spécifique est de 200 $\mu\text{Ci/g}$.

L'expérience est terminée en rétablissant la pression atmosphérique par ouverture du robinet supérieur du second barboteur et débranchement de la trompe à eau.

Les échantillons sont traités de la manière suivante : le *p*-cymène fixé par le mélange sulfonant est minéralisé selon la technique de VAN SLYKE et FOLCH, puis dosé ainsi que le gaz carbonique provenant de l'air expiré à l'état de carbonate de baryum au compteur de Geiger sans fenêtre.

Résultats

Le pourcentage d'élimination pulmonaire du *p*-cymène est faible : de 0,05 à 0,15 p. 100 entre 0 et 4 heures, il passe à 0,025 p. 100 entre 16 et 22 heures (tableau XVI). En supposant l'élimination par

TABLEAU XVI
Élimination pulmonaire du p-cymène chez la souris

Souris N°	<i>p</i> -cymène injecté		Temps de prélèvement de l'air expiré	<i>p</i> -cymène dans l'air expiré		$^{14}\text{CO}_2$ dans l'air expiré
	Activité μCi	Poids mg		Activité $m \mu\text{Ci}$	pour 100	
1	3,4	17	0 à 4 heures	2,3	0,07	0
2	3,4	17	0 à 6 heures	2,6	0,08	0
3	3,4	17	16 à 22 heures	0,8	0,025	0
4	4,3	21,2	0 à 4 heures	2,05	0,048	0
5	4,3	21,2	0 à 4 heures	6,5	0,15	0
6	4,3	21,2	0 à 4 heures	4,6	0,105	0

les poumons constante pendant les 3 jours que dure l'excrétion urinaire de toute la radioactivité injectée, le *p*-cymène rejeté par voie pulmonaire ne représenterait que 0,45 à 2,7 p. 100 de celle-ci, ce qui est certainement plus élevé que la réalité puisque l'élimination pulmonaire diminue en fonction du temps.

L'anhydride carbonique expiré ne contient pas de carbone 14 décelable par notre méthode.

III. — DÉGRADATION SANGUINE ET HÉPATIQUE IN VITRO

Nous avons recherché parmi les organes susceptibles de participer au métabolisme du *p*-cymène, ceux qui joueraient un rôle appréciable : le sang du fait de l'importance de ce véhicule dans le transport du carbone 14, le foie dans lequel le *p*-cymène se concentre particulièrement, bien qu'il ne contienne pas une grande quantité de lipides. Nous nous sommes demandé si cette affinité particulière ne pourrait trouver une explication par l'analyse du métabolisme de l'hydrocarbure dans le parenchyme hépatique.

a) Rôle du sang dans la dégradation du *p*-cymène

La dégradation est appréciée en mesurant les variations de la radioactivité fixe retrouvée dans du sang de Lapin mis à incuber en présence de *p*-cymène dans un liquide physiologique.

Technique

Un millilitre de sang de Lapin prélevé sur héparine, dilué au dixième dans 9 ml de liquide de Tyrode non phosphaté (chlorure de sodium : 8 g, chlorure de calcium anhydre : 0,10 g, chlorure de potassium : 0,20 g, chlorure de magnésium hexahydraté : 0,10 g, carbonate acide de sodium : 1 g, glucose : 1 g, dissous dans 1 l, d'eau distillée) est mis en contact avec 1 mm³ de *p*-cymène à 1000 μ Ci/g ou 1500 μ Ci/g, à 37° C pendant 2 heures en présence d'oxygène.

On détermine la radioactivité non volatile, au début de l'essai et après 2 heures de contact, en prélevant dans une coupelle d'aluminium selon le procédé exposé au chapitre III (p. 50), 0,4 ml de la dilution de sang qu'on additionne de 0,1 ml d'eau contenant 5 p. 100 de glycérine, 1 p. 100 de cyanure de potassium et 2 p. 100 de saponine. Le cyanure arrête les réactions enzymatiques et la saponine facilite l'hémolyse. Après dessiccation et pesée des résidus, on mesure la radioactivité au compteur de Geiger sans fenêtre.

Résultats

Le sang ne participe pas au métabolisme du *p*-cymène, puisque après incubation de 2 heures, la radioactivité sanguine fixe passe de 2,32 à 2,63 p. 100 pour le premier lot de *p*-cymène et de de 0,24 à 0,34 p. 100 pour le second lot. (tableau XVII).

TABLEAU XVII. — *Dégradation du p-cymène par le sang de lapin in vitro*

Animal N°	Radioacti- vité intro- duite en <i>m</i> μCi	Pourcentage de radio- activité fixe au temps 0	Pourcentage de radio- activité fixe après 2 h d'incubation
1	860	2,45	3,05
2	860	2,4	3,1
3	860	1,9	1,9
4	860	2,55	2,50
		moyenne 2,32	moyenne 2,63
5	1 290	0,18	0,28
6	1 290	0,30	0,41
		0,24	0,34

b) Rôle du foie dans la dégradation du *p*-cymène

La transformation du *p*-cymène en dérivés fixes est estimée, comme dans le cas du sang, par la mesure des variations de la radio-activité non volatile retrouvée dans des coupes ou des homogénats de foie de rat, après incubation dans un appareil de Warburg.

Technique

Sur 7 Rats albinos, de 150 à 200 g, sacrifiés par décapitation, on prélève le sang et le foie. Le sang est recueilli sur héparine, le foie est plongé dans du liquide de Tyrode à 0 °C de même composition que celui utilisé pour le sang du Lapin. Une fraction du foie est homogénéisée au tube de Potter avec neuf fois son poids de liquide de survie ; l'autre fraction est débitée en coupes de 0,1 à 0,2 mm d'épaisseur à l'aide du microtome de STADDIE et RIGGS (in UMBREIT, BURRIS et STAUFFER, 1951).

Cinq à sept millilitres d'homogénat, ou environ 700 mg de coupes additionnées de neuf fois leur poids de liquide de Tyrode réfrigéré sont placées dans la fiole de Warburg, dont le récipient central contient 0,2 ml de lessive de soude 5N déposé sur une languette de papier-filtre. Dans chacune des fioles, sauf deux qui serviront de témoins, on verse 0,1 ml d'une suspension de un volume de *p*-cymène à 1 mCi/g dans 100 volumes de plasma du Rat sacrifié (cette quantité correspond à 1 mm³ de *p*-cymène par fiole). Après passage d'un

courant d'oxygène, les fioles sont plongées dans le bain à 37 °C pendant une heure et demie. On vérifie la consommation régulière de l'oxygène.

Les déterminations de la radioactivité fixe se font sur quatre prélèvements, respectivement d'homogénat, avant et après incubation, de liquide baignant les coupes et de coupes homogénéisées dans leur liquide de survie. Les échantillons d'un volume de 0,4 ml sont déposés dans une coupelle avec 0,1 ml d'eau contenant 5 p. 100 de glycérine et 1 p. 100 de cyanure de potassium. La radioactivité après dessiccation est mesurée comme nous l'avons indiqué au chapitre des méthodes (p. 50).

Résultats

Nous avons constaté que la consommation d'oxygène des coupes et des homogénats est légèrement diminuée par la présence du *p*-cymène.

Les résultats, exprimés en pourcentage de radioactivité fixe par rapport à la radioactivité introduite sous forme de *p*-cymène, montrent la présence d'une faible quantité de carbone 14 non volatil avant le début de l'incubation, égale à $2,72 \pm 0,52$ p. 100 qui provient d'impuretés fixes contenues dans l'hydrocarbure.

Après 1 heure 30 de respiration, alors que les homogénats n'ont pas transformé l'hydrocarbure en dérivés non volatils, dont le taux reste à $2,90 \pm 0,51$ p. 100 (tableau XVIII). Les coupes

TABLEAU XVIII. — *Dégradation du p-cymène en dérivés fixes par incubation d'homogénats de foie de rat*

Essai N°	Poids d'organe homogénéisé en mg	<i>p</i> -cymène in- troduit en m μ Ci	Pourcentage d'activité fixe	
			avant incuba- tion	après incuba- tion
1 a	500	1 080	1,8	1,7
b	500	1 080	2	1,85
2 a	625	860	2,15	2,5
b	—	—	2,25	2,7
3 a	750	—	2,4	3,65
b	—	—	2,5	4,7
4 a	500	—	1,7	2,25
b	—	—	1,8	2,10
5 a	500	—	4,7	3,90
b	—	—	4,8	3,80
6 a	500	—	3,1	3,5
b	—	—	2,85	3,2
7 a	500	—	3,2	2,3
b	—	—	2,8	2,4
Moyenne			2,72	2,90
Intervalle de confiance pour un coeffi- cient de sécurité de 95 %			0,52	0,51

de foie transforment rapidement le *p*-cymène en métabolites fixes. Cette transformation atteint $24,9 \pm 4,4$ p. 100 de la radioactivité introduite (tableau XIX). Il est également intéres-

TABLEAU XIX

Dégradation du p-cymène en dérivés fixés par incubation avec des coupes de foie de rat

Essai N°	Poids de coupes en mg. (P)	<i>p</i> -cy- mène intro- duit en m μ Ci	Fraction de radioactivité fixe				μ g de <i>p</i> - cymène dégradés par 100 mg d'orga- nes (1) B-A/P	
			Homogénats avant incubation		Coupes après incubation			Liquide de survie après incuba- tion (pour- centage)
			en m μ Ci (A)	en %	en m μ Ci (B)	en %		
1 a	700	1 080	19,5	1,8	232	21,5		30
b	—	—	21,8	2,0	192	18		24,3
2 a	1 000	860	18,5	2,15	236	27,7		21,7
b	700	—	19,5	2,25	215	25		27,8
3 a	800	860	20,5	2,4	155	18		16,9
b	900	—	21,3	2,5	205	24	26	20,5
4 a	728	860	14,6	1,7	155	18	16,5	17,9
b	675	—	15,5	1,8	124	14,4	14,2	16,2
5 a	737	860	40	4,7	370	44	39,5	44,5
b	742	—	40,5	4,8	296	35	33,4	34,5
6 a	665	860	27	3,1	215	25	33,5	28,4
b	655	—	24,5	2,85	264	30,5	31,5	36,7
7 a	472	860	28,3	3,2	190	22	22	34
b	540	—	24	2,8	224	26		37
Moyenne				2,72		24,9	27,1	27,9
Intervalle de confiance pour un coefficient de sécurité de 95 %...				0,52		4,4	7,9	5

(1) 1 μ g = 1 m μ Ci de *p*-cymène.

sant de constater en vue d'une analyse ultérieure que les produits de dégradation sont hydrosolubles et diffusent dans le liquide surnageant les coupes (tableau XIX). Il est possible de calculer que 100 mg de coupes transforment en moyenne 28 ± 5 μ g de *p*-cymène dans les conditions décrites.

IV. — TENTATIVE D'IDENTIFICATION DES PRODUITS DE DÉGRADATION

Le principal métabolite du *p*-cymène, l'acide *p*-isopropylbenzoïque (acide cuminique), a été identifié pour la première fois par JACOBSEN (1879) et par NENCKI et GIACOSA (1880) dans l'urine du Chien. Il semble qu'une fraction de cet acide soit éliminée sous forme de conjugué avec le glyocolle (WILLIAMS, 1959).

Nous avons essayé, par chromatographie, d'identifier aux substances précédentes, les métabolites radioactifs hydrosolubles éliminés par la Souris et le Rat qui ont reçu du *p*-cymène ^{14}C , afin de vérifier que le composé marqué subit la même dégradation que l'hydrocarbure inactif.

Méthode

L'urine et le foie du Rat, ainsi que l'urine de la Souris ont fait l'objet de cette étude.

Extraction des métabolites. L'urine des rats ou des souris auxquels on a administré par voie intrapéritonéale 1 ml ou 0,2 ml d'une solution de *p*-cymène à 10 p. 100 dans l'huile d'olive est recueillie pendant trois jours. Le liquide prélevé est filtré, hydrolysé pendant 2 minutes à l'ébullition à pH 1 avec de l'acide chlorhydrique, puis, extrait par du chloroforme, qu'on dessèche au sulfate de sodium anhydre et qu'on évapore à sec. Le résidu est repris par quelques gouttes de chloroforme.

Afin de caractériser les conjugués du glyocolle, l'urine de trois rats a été récoltée sous du toluène en présence d'un antiseptique (acide mercurothiolique, merseptyl), pour éviter une hydrolyse fermentaire. L'urine est filtrée et acidifiée à pH 2 par de l'acide chlorhydrique.

Les métabolites du foie sont extraits à partir des coupes de cet organe incubées *in vitro* dans du liquide de Tyrode avec du *p*-cymène, comme nous l'avons décrit dans le paragraphe précédent. Le liquide surnageant est porté à l'ébullition, filtré et extrait par le chloroforme de la même façon que l'urine.

Technique de chromatographie. Les échantillons préparés, sous un volume variable selon leur radioactivité, sont déposés à 3 cm de l'un des bords de feuilles de papier Whatman n° 1 découpées aux dimensions des cuves utilisées. Pour servir de témoins, 3 à 10 mm³ de solutions alcooliques à 1 p. 100 de divers acides aromatiques sont ensemencés dans les mêmes conditions.

La migration est effectuée par chromatographie descendante pendant 9 heures à 22 °C avec le bain suivant :

Butanol.....50
Ammoniaque 1,5 N..50 (REID et LEDERER, 1951)

Les taches radioactives sont mises en évidence par exposition des chromatogrammes sur film radiographique. Les substances acides de l'urine et les témoins sont révélés, en pulvérisant une solution aqueuse d'iodate de potassium à 0,2 p. 100, d'iodure de potassium à 1 p. 100 et d'amidon soluble à 1 p. 100. Ce réactif donne une coloration violette en présence des fonctions acides. Enfin, les dérivés conjugués avec le glycocole sont recherchés par pulvérisation d'une solution de *p*-diméthylaminobenzaldéhyde à 10 p. 100 dans l'anhydride acétique, qui, par chauffage à 120° C pendant 2 minutes, développe une coloration variant du jaune au rouge avec les glycoconjugués, ainsi d'ailleurs qu'avec de nombreuses autres substances (MASRY, SMITH et WILLIAMS, 1956).

Résultats

La chromatographie met en évidence trois taches (fig. 26 a, b et c) radioactives dont les R_f, les réactions de pH et les pourcentages dans les extraits chloroformiques sont les suivants :

Tache A R_f : 0,26 à 0,32, réaction acide, de 20 à 50 %
Tache B R_f : 0,51 à 0,59, réaction acide, de 40 à 70 %
Tache C R_f : 0,88 à 0,92, non acide, environ 5 %.

Identification de l'acide p-isopropylbenzoïque. Le R_f de l'acide cuminique est de 0,57 à 0,59 (fig. 26 d), il est semblable à celui de la tache B. Nous avons reconnu l'identité de ces deux substances par chromatographie d'une dilution isotopique de l'extrait urinaire avec de l'acide *p*-isopropylbenzoïque inactif et par l'utilisation d'un autre solvant (méthyléthylcétone : 50, ammoniaque 1,5 N : 50) qui conduit pour les deux composés à un R_f identique égal à 0,32.

Essai de caractérisation des autres composés. Différents acides aromatiques ont été comparés dans un but de caractérisation aux substances A et C des extraits urinaires et hépatiques. Ce sont l'acide *p*-hydroxybenzoïque (R_f : 0,13), l'acide benzoïque (R_f : 0,39), l'acide *p*-toluïque (R_f : 0,47) et l'acide téréphtalique (R_f : 0). Pour ce dernier acide, nous avons refait une chromatographie à l'aide de propanol : 60, ammoniaque : 30, eau : 10, et obtenu un R_f de 0,58., les R_f des composés de l'urine étaient dans ces conditions de 0,76, 0,91 et 0,96. Aucun des acides précédents ne correspond donc aux métabolites recherchés.

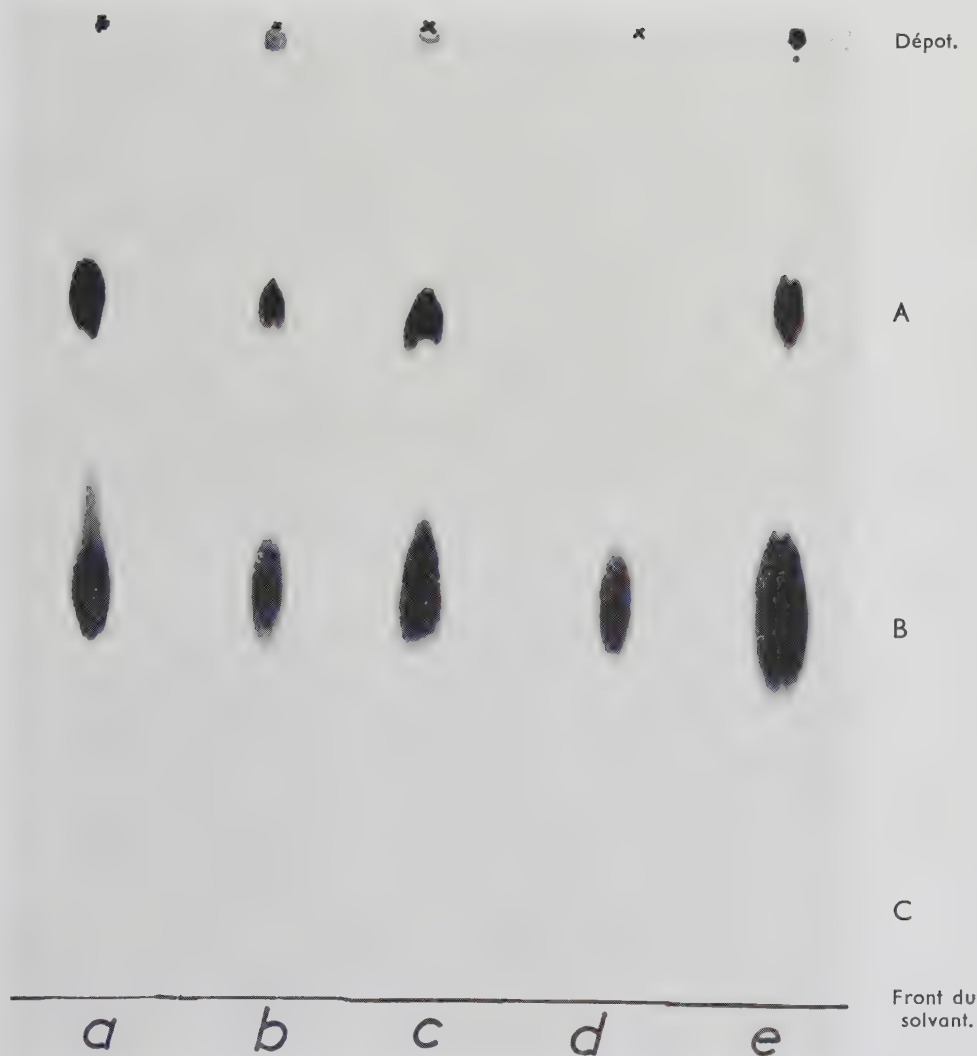


FIG. 26. — Autoradiographie de chromatographies des produits de dégradation du *p*-cymène ^{14}C et de l'acide cuminique ^{14}C .

- a) Extrait urinaire de Souris.
- b) Extrait urinaire de Rat.
- c) Extrait hépatique de Rat.
- d) Acide cuminique ^{14}C conservé sous vide à -20°C .
- e) Acide cuminique ^{14}C conservé à l'air.

Radiolyse de l'acide cuminique ^{14}C . L'acide *p*-isopropylbenzoïque ^{14}C , intermédiaire de la synthèse du *p*-cymène, conservé sous vide à -20°C ne fournit qu'une seule tache de Rf 0,58 par notre méthode ; mais au cours de la conservation à l'air, cet acide subit une radiolyse qui aboutit à la formation d'un produit de dégradation dont le Rf est égal à 0,30-0,32 (fig. 26 e), identique au dérivé A obtenu dans l'urine et le foie. Le composé A ne serait donc pas un métabolite normal du *p*-cymène, mais résulterait de la radiolyse de l'acide cuminique excrété par l'animal. Ce fait explique les proportions variables de produits A et B retrouvés dans les extraits urinaires et hépatiques.

Recherche des conjugués du glycocole. Il ne nous a pas été possible d'identifier le composé C à un conjugué de l'acide cuminique et du glycocole, car les taches Rf 0,88 à 0,92 ne donnent aucune coloration en présence du réactif des glycoconjugués.

Le *p*-cymène est transformé par le foie, en métabolites hydrosolubles, éliminés tels quels par l'urine. Le principal est l'acide *p*-isopropylbenzoïque qui subit du fait de la radioactivité une dégradation en une substance acide non caractérisée. Ces deux composés représentent 90 % de la radioactivité des extraits chloroformiques. Il existe environ 5 à 10 p. 100 d'un troisième métabolite qui est neutre et que nous n'avons pas pu identifier.

V. — DISCUSSION DES RÉSULTATS

Comme nous l'avons vu, l'étude quantitative du métabolisme du *p*-cymène dans l'organisme animal a comporté la recherche des différentes voies d'élimination des métabolites et celle de la dégradation de l'hydrocarbure par le foie. Comme la seconde partie de l'analyse explique les observations de la première, nous discuterons d'abord du rôle du foie dans l'oxydation du *p*-cymène.

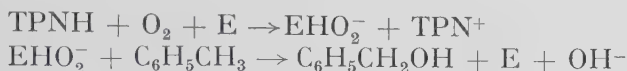
OXYDATION DU *p*-CYMÈNE PAR LE FOIE

A la différence du sang, le foie du Rat est capable d'oxyder le *p*-cymène en métabolites hydrosolubles dont le principal est l'acide cuminique. Il faut remarquer que la dégradation nécessite l'intégrité des cellules hépatiques, puisque les homogénats sont incapables de transformer l'hydrocarbure.

Les processus d'oxydation rencontrés ici, sont certainement le fait du système enzymatique oxydatif particulier caractérisé dans les microsomes hépatiques par BRODIE et ses collaborateurs (BRODIE, 1956, GILETTE, 1958, BRODIE, GILETTE et LADU, 1958, BRODIE, 1962). Ces enzymes en transformant en dérivés hydrosol-

lubles les substances étrangères liposolubles, non assimilables, présentes dans les aliments (terpènes, alcaloïdes, stéroïdes) sont capables d'assurer leur élimination urinaire. Pour agir ils exigent la présence d'oxygène et de triphosphopyridine nucléotide (TPNH) et catalysent l'incorporation directe de l'oxygène moléculaire dans le substrat.

Dans le cas de toluène on aurait :



L'oxydation ultérieure en acide se fait par les alcools et les aldéhydes deshydrogénases présentes dans la fraction soluble des cellules.



On peut penser que, les mêmes processus interviennent pour le *p*-cymène et il semble que l'absence de métabolisme par les homogénats à l'encontre des coupes de foie soit due à une destruction des enzymes microsomiques, puisque les deshydrogénases sont solubles.

LE CYCLE ENTÉROHÉPATIQUE

Les dérivés hydrosolubles formés par le foie sont éliminés exclusivement par voie urinaire. Nous avons vu que l'un de ceux-ci subissait du fait de la radioactivité, une radiolyse importante. Nous ne pouvons pas dire si la décomposition se produit au cours du métabolisme du *p*-cymène ou à la suite des manipulations et de la conservation des extraits urinaires et hépatiques.

Après oxydation par le foie, de nombreux hydrocarbures benzéniques subissent comme le *p*-cymène un cycle entérohépatique et sont éliminés par l'urine sans apparaître dans les matières fécales. Lorsque ces composés ont un poids moléculaire peu élevé ils sont partiellement excrétés sans transformation par les poumons. C'est ainsi que, chez le Lapin, 45 p. 100 du benzène ingéré à la dose de 0,34 à 0,50 g/kg est exhalé en 48 heures par les poumons, l'élimination urinaire n'atteignant pendant ce temps que 35 p. 100 (PARKE et WILLIAMS, 1953). De même 18 p. 100 du toluène est retrouvé dans l'air expiré par des Lapins qui ont reçu oralement 0,35 g/kg de ce composé (SMITH, SMITH et WILLIAMS, 1954). Nous n'avons pas observé une telle élimination dans le cas du *p*-cymène puisqu'elle reste inférieure à 2 p. 100 de la dose administrée à la Souris. Il semble que la tension de vapeur peu élevée et la rapidité du métabolisme de l'hydrocarbure soient un obstacle à l'excrétion pulmonaire.

L'absence de gaz carbonique radioactif dans l'air expiré prouve que la molécule de *p*-cymène n'est pas scindée et que le radical méthyl dans lequel est incorporé le carbone 14 reste fixé au noyau benzénique.

* * *

Le *p*-cymène est dégradé par le foie *in vitro* à raison de 28 μ g pour 100 mg de coupes en 90 minutes. Il se forme des dérivés hydrosolubles, dont le principal est l'acide cuminique, qui sont rejetés par l'urine dans une proportion supérieure à 90 p. 100. Les matières fécales et l'air expiré ne participent pas à l'élimination de la radioactivité.

Ces résultats permettent de mesurer chez l'animal, l'absorption du *p*-cymène ^{14}C par simple détermination de la radioactivité éliminée dans l'urine.

CHAPITRE VIII

MESURE DE LA RÉSORPTION SANGUINE ET LYMPHATIQUE DU *p*-CYMÈNE

Après avoir montré les voies de passage du *p*-cymène à travers l'épiderme nous nous sommes demandé quelles étaient les modalités de la résorption au niveau du derme.

L'analyse de cette phase de l'absorption percutanée nécessite l'emploi de l'animal vivant. En effet, les travaux effectués sur la peau en survie ne rendent compte que de l'absorption épidermique, car la résorption dans le derme est perturbée par l'absence d'irrigation sanguine et lymphatique.

Nous avons étudié dans une première partie du travail, le rôle du sang et en particulier celui du plasma et des hématies dans les processus de résorption du *p*-cymène, chez le Lapin *in vivo* et dans une seconde partie, nous nous sommes préoccupé de connaître l'importance de la lymphe dans cette résorption chez le Rat *in vivo*, bien que GRIESEMER, (1960) considère que seules les grosses molécules sont tributaires de cette voie de pénétration.

I. — RÉSORPTION SANGUINE CHEZ LE LAPIN

Les éléments sanguins qui peuvent participer à la résorption sont les hématies, les leucocytes et le plasma. Parmi ceux-ci, les globules rouges ont été les plus étudiés et il semble qu'ils aient une grande affinité pour les substances lipophiles, comme l'ont confirmé récemment SCHANKER, NAFPLIOTIS et JOHNSON (1961). Toutefois, cette affinité requiert une dissolution préalable dans le plasma pour se manifester. Il ne faut donc pas négliger les autres fractions du sang.

Nous avons examiné par autoradiographie la répartition du *p*-cymène *in vitro* dans le sang du Lapin, afin d'estimer l'importance relative des constituants sanguins dans le transport de l'hydrocarbure, puis, poursuivi notre recherche *in vivo* par le dosage du composé marqué dans les hématies et le plasma, après absorption à travers la peau du même animal.

A) Autoradiographie du sang de lapin incubé *in vitro* en présence de *p*-cymène

Nous avons appliqué notre méthode d'autoradiographie sur du sang de lapin centrifugé et congelé, après contact avec du *p*-cymène marqué.

Technique

10 ml de sang de lapin prélevé sur héparine, est mis en contact avec 2 mm³ de *p*-cymène à 1 mCi/g à 37° C., pendant une heure. Après ce délai, le sang est centrifugé dans un tube de matière plastique, puis congelé par immersion dans l'azote liquide. Le culot obtenu est séparé du tube à centrifuger et débité sur un microtome à congélation selon un plan perpendiculaire à la sédimentation. Les autoradiographies sont obtenues par la technique que nous avons décrite au chapitre III (p. 29) à partir des blocs congelés et des coupes desséchées.

Résultats

La répartition du *p*-cymène dans le sang est hétérogène. Les images obtenues à partir des blocs congelés, montrent que la concentration radioactive dans les hématies, est 1,3 à 2,6 fois plus élevée que dans le plasma, comme l'indique les résultats des mesures densitométriques effectuées sur les autoradiographies (tableau XX). La radioactivité des leucocytes est plus faible que celle du plasma.

TABLEAU XX

Répartition du p-cymène dans les hématies et le plasma du lapin in vitro
(comparativement à la concentration du plasma prise égale à 100)

N° de l'essai	concentration des hé- maties
1	130
2	150
3	185
4	200
5	240
6	260

Ainsi le *p*-cymène, mis en contact du sang de lapin se concentre deux fois plus dans les hématies que dans le plasma. Le taux de l'hydrocarbure reste faible dans les leucocytes.

B) Résorption sanguine du *p*-cymène *in vivo* chez le Lapin (1)

Nous avons analysé, plus en détail *in vivo*, les modalités de la résorption du *p*-cymène par les hématies et le plasma du Lapin, après sa pénétration à travers l'épiderme, sans plus nous attacher au rôle des leucocytes qui concentrent peu la radioactivité.

A la technique de FELDBERG et PATTON (1951) et, ADACHI et CHOW (1962) qui décrivent chez le Chat ou le Chien, un système de perfusion de la peau située au-dessus du genou de l'animal par l'artère et la veine saphène, nous avons préféré, un procédé plus simple, qui consiste à recueillir la totalité du sang qui s'écoule du tronc veineux de l'oreille du Lapin sur laquelle est appliqué l'hydrocarbure, puis, à doser la radioactivité du sang extravasé.

Méthode

Sept Lapins, dont six gris et un blanc, pesant de 2,2 kg à 3 kg, sont anesthésiés par injection intraveineuse d'uréthane à la dose de 1 g/kg à 1,50 g/kg de poids corporel. Après ligature de la veine du bord antérieur de l'oreille, on dégage le tronc commun de la veine centrale et de la veine marginale, puis on cathétérise ce vaisseau avec un tube de polyéthylène (1,4 mm de diamètre) pour recueillir le sang efférent de l'oreille (fig. 27). Après injection intraveineuse d'héparine à la dose de 10 mg/kg, on dépose, au centre de la face externe du lobe de l'oreille épilée aux ciseaux courbes, 0,1 ml de *p*-cymène à 200 μ Ci/g. On prévient l'évaporation de ce liquide en fixant au préalable à l'aide de colle de Unna une cloche à tubulure recouvrant une surface de 4 à 6 cm².

a) MESURE DE LA RADIOACTIVITÉ SANGUINE

Tout le sang qui entraîne le *p*-cymène absorbé par la peau est recueilli pendant 30 à 45 minutes, de telle façon, que le volume qui s'écoule soit d'environ 20 ml. La détermination de l'hématocrite et la numération des hématies effectuées, le plasma est séparé par centrifugation des globules qui sont lavés par remise en suspension dans une solution de chlorure de sodium à 9 p. 1.000, suivi de centrifugation. Le culot globulaire et le plasma portés à 90 °C sont traversés pendant 3 heures par un courant d'air qui entraîne le *p*-cymène, selon une technique que nous avons préconisée au chapitre des méthodes (p. 43). L'hydrocarbure est capté dans le mélange d'acide sulfurique et d'anhydride phosphorique chauffé à 100 °C. Le carbone fixé par ce mélange est minéralisé à l'état de gaz carbonique suivant

(1) Cette étude a été présentée à l'Académie des Sciences, *C. R. Acad. Sci.*, 1963, 256, p. 4529-4532.

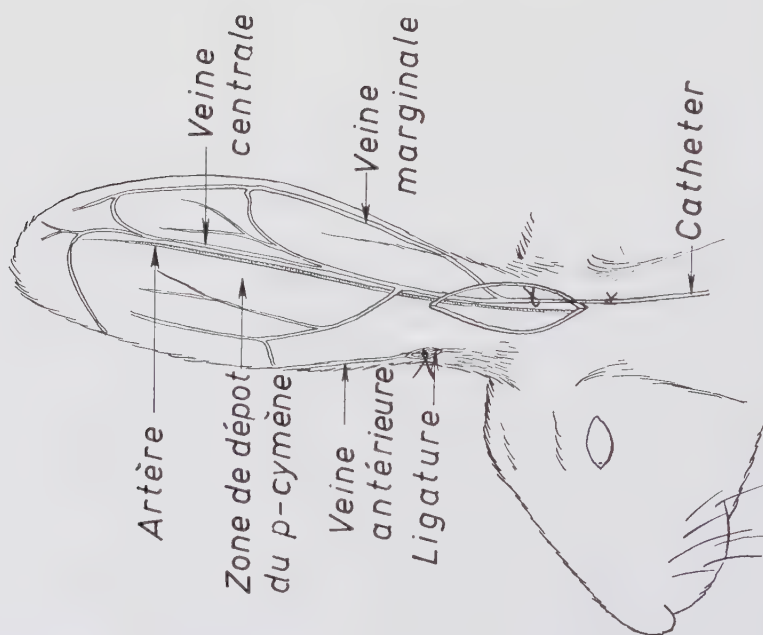


FIG. 27. — Cathétérisme des veines de l'oreille du Lapin.

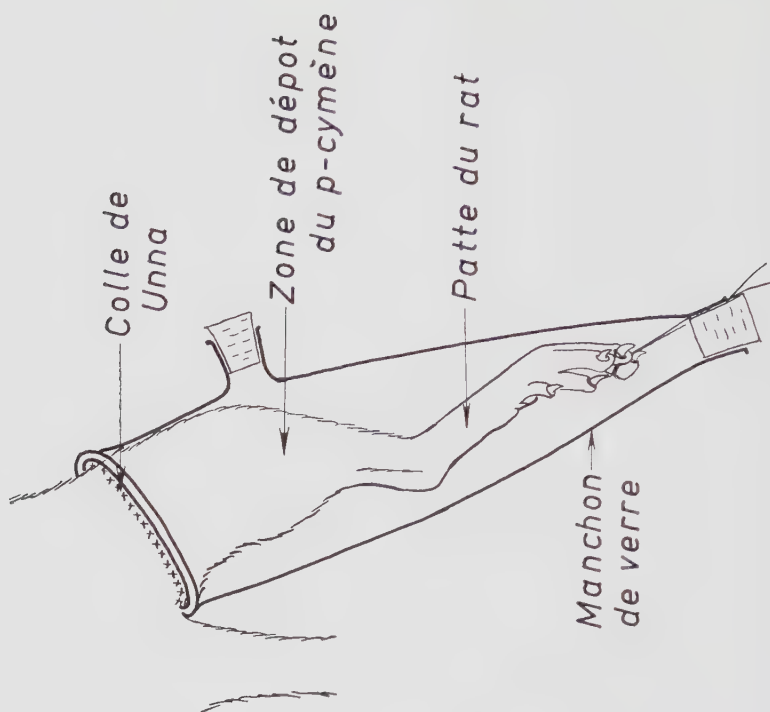


FIG. 28. — Mode d'application de p-cymène sur la patte du Rat.

la technique de VAN SLYKE et FOLCH et précipité sous forme de carbonate de baryum, dont on mesure finalement la radioactivité.

La radioactivité résiduelle du plasma et des globules est déterminée sur des étalements desséchés préparés comme nous l'avons indiqué au chapitre III (p. 50).

b) Résultats

Dans le tableau XXI sont rassemblées les concentrations du *p*-cymène dans le plasma et dans les hématies ; ces concentrations sont une fois et demie à deux fois plus élevées dans les globules (6,6 à 35 $\mu\text{g/ml}$) que dans le plasma (3,9 à 21,6 $\mu\text{g/ml}$), mais la quantité totale transportée, très variable d'un animal à l'autre est sensiblement égale dans les deux fractions (de 40 à 330 μg dans les globules et de 35 à 249 μg dans le plasma), du fait de la valeur du volume globulaire que nous avons trouvée comprise entre 36,5 et 43 p. 100.

TABLEAU XXI
Dosage du p-cymène sanguin
(exprimé en μg de *p*-cymène)

Lapin N°	temps de contact	volu- me de sang en ml	<i>p</i> -cymène par ml		<i>p</i> -cymène total		
			héma- ties	plasma	héma- ties	plasma	sang total
gris 1	30 mn	21	15	9,6	120	125	245
— 2	30 mn	20	17,8	8,3	130	105	235
— 3	30 mn	13	8,2	5,1	41,2	41	82,2
— 4	30 mn	15	6,6	3,9	40	35	75
— 5	35 mn	25	12,5	7	125	105	230
— 7	40 mn	23	22,4	14,5	203	199	402
blanc	45 mn	21	35	21,6	330,2	249,2	579,4

Les résultats des mesures de la radioactivité non volatile détectée dans les fractions sanguines après dessiccation, rapportées à la radioactivité spécifique de l'échantillon de *p*-cymène sont réunis dans le tableau XXII. Ils expriment en *p*-cymène la quantité de produits de dégradation de ce dernier, présents dans les fractions sanguines. Cette quantité varie de 0 à 17,3 $\mu\text{g/ml}$ dans les hématies et de 1,6 à 10,5 $\mu\text{g/ml}$ dans le plasma. Les métabolites paraissent préférentiellement transportés par le plasma chez les Lapins gris. Le Lapin blanc se distingue par des chiffres de valeurs plasmatiques plus faibles, mais nous ne saurions tirer de cette seule détermination de conclusion concernant les différences raciales.

La quantité totale de *p*-cymène et de ses produits de dégradation recueillis dans le sang qui s'écoule de l'oreille, pendant le temps d'exposition du *p*-cymène à la surface de la peau, permet d'estimer

TABLEAU XXII

Teneur du sang en métabolites du p-cymène
(exprimé en μg de p-cymène)

Lapin No	temps de contact	volu- me de sang en ml	métabolites par ml		métabolites totaux		
			héma- ties	plasma	héma- ties	plasma	sang total
gris 1	30 mn	21	10	10,5	80	135	215
— 2	30 mn	20	0	2,95	0	37,5	37,5
— 3	30 mn	13	1,5	3,75	7,5	30	37,5
— 4	30 mn	15	1,67	4,2	10	38	48
— 5	35 mn	25	0,55	3	5,5	45	50,5
— 7	40 mn	23	0,76	1,6	7	22	29
blanc	45 mn	21	17,3	7,9	165	91	256

la vitesse de passage transcutanée de l'hydrocarbure. Cette vitesse, fonction de l'irrigation, a été trouvée comprise entre 120 et 500 μg en une demi-heure pour une surface de contact de 4 à 6 cm^2 .

La concentration du p-cymène dans les hématies est une fois et demie à deux fois plus élevée que dans le plasma. Celui-ci joue néanmoins un rôle important puisqu'il participe pour moitié au transport de l'hydrocarbure du fait de la valeur des hématocrites. Bien qu'insoluble dans l'eau, le p-cymène est supposé contracter avec les lipoprotéines plasmatiques et, peut-être, les chylomicrons (GERARDE, 1960) des liaisons qui permettent sa dispersion dans une phase aqueuse, sans qu'il soit nécessaire de faire intervenir de notions d'hydrophilie.

Ces résultats sont à opposer à ceux obtenus avec d'autres substances lipophiles pour lesquelles le rôle du plasma dans le transport sanguin est moins important. En effet NICLOUX (1906) trouve que le chloroforme se fixe électivement huit fois plus dans les hématies que dans le plasma, de même le chlorure d'éthyle est transporté dans une proportion de 75 p. 100 par les globules rouges (CAMUS et NICLOUX, 1907). Enfin FABRE (1948) a montré que le benzène et le toluène se concentrent dans les hématies du Lapin et du Cobaye au cours de l'intoxication par ces solvants.

L'hypothèse selon laquelle les substances pénétrantes sont à la fois solubles dans les lipides et dans l'eau (ISLER, 1950; MEYER, KERK, et MEYER, 1960; SHELMIER, 1960) n'est pas vérifiée dans le cas du p-cymène, puisque l'hydrocarbure, bien qu'insoluble dans l'eau, est facilement résorbé par le plasma et les hématies, dont la teneur en lipides et la vitesse de renouvellement sont suffisantes pour entraîner le composé au fur et à mesure de son arrivée dans le derme. Cette constatation confirme les résultats de VALETTE, CAVIER et SAVEL (1954 a) qui conduisent aux conclusions suivantes: dans la série des hydrocarbures des alcools et des esters; « les composés

les plus absorbables par la peau dissolvent bien les lipides, peu le cholestérol et ne sont pratiquement pas miscibles à l'eau ».

Notre méthode d'analyse n'est pas assez fine pour apprécier avec précision le taux de résorption du *p*-cymène. La surface cutanée à l'hydrocarbure est mal définie (4 à 6 cm²) et le débit du sang qui s'écoule de l'oreille est variable d'un animal à l'autre. Malgré ces restrictions on constate que la résorption sanguine, rapide, est comprise entre 50 et 200 µg/cm²/heure.

Dans toutes les expériences, on retrouve une radioactivité non volatile dans le sang. Celle-ci n'est pas entièrement attribuable aux impuretés fixes du *p*-cymène, puisqu'elle dépasse 2,5 p. 100. L'hydrocarbure subit donc une dégradation probablement dans les tissus sous-cutanés de l'oreille et non seulement dans le foie, puisque, d'une part, le sang artériel du Lapin est dépourvu de radioactivité lorsque nous le vérifions (3 essais) et que, d'autre part, nous recueillons la totalité du sang après son passage dans l'oreille. Ces produits de métabolisme, parmi lesquels nous avons caractérisé l'acide *p*-isopropylbenzoïque sont hydrosolubles ; ils sont transportés en plus grande proportion dans le plasma que dans les hématies.

II. — RÉSORPTION LYMPHATIQUE CHEZ LE RAT

Bien que l'irrigation lymphatique soit moins intense que l'irrigation sanguine des organes, la lymphe participe néanmoins au retour dans la circulation générale de différentes substances (glycérides, protides). Nous nous sommes demandés si le *p*-cymène, après son absorption percutanée, ne pouvait pas être résorbé par cette voie, par suite de sa lipophilie.

La nécessité d'utiliser un faible volume de *p*-cymène radioactif, rend peu aisé l'expérimentation sur de gros animaux dont les canaux lymphatiques sont faciles à cathétériser. Notre choix s'est porté sur des espèces de petite taille, mais les difficultés rencontrées pour recueillir la lymphe cutanée, nous ont conduit à adopter une méthode d'étude indirecte dont le principe est le suivant : après application de *p*-cymène ¹⁴C sur la peau de la patte du Rat, on dose le composé marqué dans le ganglion poplité qui est placé sur le passage des canaux lymphatiques irriguant une partie du membre postérieur de cet animal, comme l'a constaté COHEN (1961 *b*) à l'aide de colloïdes radioactifs (et nous-mêmes ultérieurement avec de l'encre de chine), injectés dans le coussinet plantaire. Une comparaison avec la radioactivité du ganglion de la patte non exposée à l'hydrocarbure, permet d'estimer l'importance du transport lymphatique. Les mesures de la radioactivité ont été effectuées avec un scintillateur liquide, car les ganglions minéralisés ont une concentration radioactive trop faible pour être détectée.

Technique

La patte postérieure droite d'un Rat de 230 à 250 g, tondu aux ciseaux, est introduite dans un tube de verre muni d'une tubulure à sa partie supérieure. L'étanchéité entre le tube et la racine du membre est assurée à l'aide de colle de Unna (fig. 28). On introduit par la tubulure 0,1 ml de *p*-cymène d'une activité spécifique voisine de 200 $\mu\text{Ci/g}$ qu'on dépose sur la peau épilée. L'hydrocarbure est laissé une demi-heure sur la patte maintenue immobile. Après ce délai, le Rat est sacrifié par décapitation et le sang qui s'écoule des carotides est prélevé sur héparine.

Afin d'éviter une contamination radioactive des prélèvements ultérieurs, la peau est découpée à une distance de un centimètre autour de l'insertion du tube sur la patte ; elle est retournée, puis ligaturée sur la partie large du manchon de verre. Le membre est alors dépouillé lentement de façon que la face externe de la peau qui est imprégnée de *p*-cymène reste à l'intérieur du tube de contention.

Le ganglion poplité est alors isolé en se référant aux descriptions anatomiques de GREENE (1955), puis, pour servir de terme de comparaison le ganglion homologue est prélevé dans la patte non exposée à l'hydrocarbure. Toujours dans le but d'éviter les contaminations radioactives, on utilise pour chaque échantillon un matériel de dissection différent. Ces prélèvements sont pesés dans des flacons de comptage pour scintillation liquide tarés, mis en contact pendant 24 heures à 0 °C avec 2 ml d'alcool éthylique absolu et enfin, complétés comme nous l'avons indiqué aux techniques (p. 51) à l'aide de toluène contenant du DPO et du POPOP. Des échantillons de sang sont préparés dans des conditions identiques puis filtrés.

Après mesure de la concentration radioactive de ces échantillons, on exprime la radioactivité en microgrammes de *p*-cymène, sachant que 1 μg d'hydrocarbure correspond à 407 des /m dans les conditions décrites.

Résultats

Le tableau XXIII montre que la concentration du carbone 14, exprimée en microgrammes de *p*-cymène par gramme de tissu est en moyenne quatre fois plus élevée dans les ganglions (127 ± 46 et $133 \pm 58 \mu\text{g/g}$) que dans le sang ($32 \pm 14,3 \mu\text{g/g}$).

Il n'existe pas de différence entre la teneur en *p*-cymène du ganglion poplité de la patte sur laquelle on a déposé l'hydrocarbure et la patte témoin, que les résultats soient rapportés au poids de chaque ganglion ($0,67 \pm 0,18$ et $0,68 \pm 0,31 \mu\text{g}$) ou à un gramme de tissu lymphatique (127 ± 46 et $133 \pm 58 \mu\text{g/g}$).

Le fait que les ganglions poplités des deux pattes soient quatre fois plus riches en carbone 14 que le sang, montre que ceux-ci sont

TABLEAU XXIII

Mesure de la concentration du carbone 14, exprimée en *p*-cymène, dans les ganglions poplités et le sang du Rat, après absorption percutanée de l'hydrocarbure appliqué sur la patte postérieure

Rat N°	Ganglion poplité de la patte exposée à l'hydrocarbure			Ganglion poplité de la patte de référence			Concen- tration du <i>p</i> - cymène par gramme de sang en µg
	Poids du gan- gion en mg	Teneur en <i>p</i> - cymène µg	Concen- tration du <i>p</i> - cymène en µg/g	poids du gan- gion en mg	Teneur en <i>p</i> - cymène en µg	Concen- tration du <i>p</i> - cymène en µg/g	
1	6,3	1	160	4,2	0,95	226	74
2	5,3	0,83	156	6,3	1,34	213	31,5
3	3	0,82	240	4,7	0,83	176	41
4	4,5	0,51	113	5	0,81	162	27
5	6,5	0,49	75	7,3	0,36	49,5	19,5
6	7,3	0,74	102	5,6	0,40	71	19
7	6,2	0,55	89	4,9	0,38	78,5	19,2
8	5	0,415	83	4,4	0,38	87	25
moyenne	5,56	0,67	127	5,30	0,68	133	32
intervalle de confiance pour un coefficient de sécurité de 95 %	1,05	0,18	46	0,87	0,31	58	14,3

capables de fixer le *p*-cymène. Or, la fixation de l'hydrocarbure dans le ganglion placé sur le passage des vaisseaux lymphatiques, qui irriguent la peau exposée au composé marqué, n'est pas plus importante que dans le ganglion témoin. Il semble donc que, la lymphe ne participe pas à la résorption du *p*-cymène absorbé à travers la peau. Nous confirmons ainsi les conclusions de GRIESEMER (1960) qui pense que, seules les grosses molécules empruntent la voie lymphatique.

Il est possible d'expliquer ces résultats en considérant que: premièrement, la patte de l'animal maintenue immobile ralentit l'irrigation lymphatique et diminue la quantité de *p*-cymène transporté, deuxièmement, la lymphe qui contient une quantité de lipides dix fois plus faible que le sérum sanguin (FABRE et ROUGIER, 1961) ne peut capter que très peu d'hydrocarbure, puisque nous avons vu que la capacité de fixation des organes dépendait de leur teneur en lipides.

* * *

En résumé, la résorption du *p*-cymène, après sa pénétration à travers la peau se fait essentiellement par voie sanguine, la concentration de l'hydrocarbure est 1,6 à 2 fois plus élevée dans les

hématies que dans le plasma, toutefois la quantité totale transportée dans chacune des fractions est identique, du fait de la valeur des hématocrites. Dans les leucocytes le taux du composé marqué est négligeable.

Le rôle de la lymphe nous semble peu important, puisque nous n'avons pas pu mettre en évidence de résorption lymphatique du *p*-cymène, par mesure de la radioactivité des ganglions situés sur le trajet des voies lymphatiques irriguant la peau.

CHAPITRE IX

MESURE GLOBALE DE LA PÉNÉTRATION CUTANÉE CHEZ LA SOURIS (1)

Après avoir étudié les voies de passage du *p*-cymène à travers la peau, nous avons été amené à envisager la mesure de la vitesse de résorption cutanée de cette substance, à la faveur des résultats qui, obtenus précédemment, ont montré que l'hydrocarbure était entièrement dégradé en dérivés hydrosolubles, tous éliminés par l'urine.

Nous avons déterminé la cinétique de l'absorption cutanée chez la Souris selon le principe suivant : les animaux dont l'urine est recueillie, reçoivent au préalable sur la peau du dos tondu, un volume constant de *p*-cymène radioactif qui est laissé en contact pendant un temps variable. La concentration de la radioactivité recueillie dans les urines est le reflet de la pénétration percutanée du *p*-cymène.

Nous avons construit la courbe exprimant la pénétration du *p*-cymène en fonction du temps de contact et apprécié comme le conseille BLANK (1960 *b*) la vitesse de passage par la détermination de la quantité pondérale ou du nombre de molécules d'hydrocarbure absorbées par unité de surface et de temps. Nous avons enfin cherché à mettre en évidence l'influence de la température extérieure sur l'absorption.

Technique

Des Souris de sexe mâle, d'un poids de 21 à 25 g, sont tondues aux ciseaux sur le dos et les flancs, puis introduites dans l'appareil de contention que nous avons décrit à propos de l'étude autoradiographique de la pénétration chez la Souris (p. 61). On dépose sur la peau 0,1 ml (86 mg) de *p*-cymène de concentration radioactive connue (200 à 50 μ Ci) suivant la durée de l'essai : moins d'une minute, puis quinze, trente, quarante cinq, soixante quinze et quatre vingt dix minutes. Un nombre total de quarante huit Souris est soumis à cette expérience effectuée à une température de 20 à 22 °C. D'autre part, cinq animaux sont exposés pendant une heure à une température de 12 °C. L'excès de solvant est

(1) Cette étude a été présentée à l'Académie des Sciences, *C. R. Acad., Sci.*, 1963, 256, p. 1628-1630.

éliminé rapidement par un tampon de papier absorbant et par un courant d'air maintenu pendant 30 minutes. Les rongeurs sont ensuite placés individuellement pendant 72 heures dans la cage à métabolisme, qui permet de recueillir les urines. Les déterminations suivantes sont alors effectuées :

1) MESURE DE LA SURFACE CUTANÉE EXPOSÉE AU P-CYMÈNE

La surface de peau exposée est estimée par planimétrie de la tache laissée sur la peau des animaux par l'hydrocarbure, auquel on a incorporé 1 p. 1 000 de Soudan III. La mesure est faite sur la peau de 25 Souris préalablement dépouillées.

2) QUANTITÉ DE P-CYMÈNE ABSORBÉ

Connaissant l'activité spécifique du solvant déposé, il est facile de connaître le poids de *p*-cymène absorbé à travers la peau, en mesurant la radioactivité urinaire.

Tous les résultats sont exprimés par la moyenne des mesures et l'écart à la moyenne de façon que l'intervalle de confiance corresponde à une sécurité de 95 p. 100.

Sur 5 animaux sacrifiés après élimination urinaire de 72 heures, on vérifie l'absence de radioactivité résiduelle par autoradiographie.

Résultats

La surface cutanée exposée dans les conditions décrites est sensiblement constante et égale à $25,5 \text{ cm}^2 \pm 1 \text{ cm}^2$ sur les 25 animaux contrôlés (tableau XXIV).

TABLEAU XXIV

Surface sur laquelle s'étale 0,1 ml de p-cymène coloré par 1 p. 1000 de Soudan III

Souris N°	Surface cm ²	Souris N°	Surface cm ²
A	22	O	25,5
B	24,5	P	25
C	26	Q	28
D	22,5	R	24
E	26	S	25
F	27,5	AK	27
G	30	AL	26,5
H	25	AM	24
J	27	AN	24
K	27,5	AZ	28
L	23	BA	26
M	24,5	BD	26,5
N	22,5		

Cette valeur, adoptée pour toutes les déterminations, correspond à environ 40 p. 100 de la surface cutanée totale qui a été mesurée par le même procédé sur huit Souris de 22 g : $65 \pm 3,2 \text{ cm}^2$.

Les déterminations de la radioactivité urinaire, les moyennes et l'erreur qui s'y attache sont consignés, pour chaque température et chaque temps dans le tableau XXV.

TABLEAU XXV

Quantité totale de p-cymène, exprimée en milligrammes, résorbé par la peau de la Souris en fonction de la température et du temps de contact

	Durée du contact à 22 °C							Durée du contact à 12 °C
	moins de 1 mn	15 mn	30 mn	45 mn	60 mn	75 mn	90 mn	60 mn
	2 0,6 1,93 2,06	3,2 3,25 3,4 3,5 3,9	4 4,6 4,9 5 5,1 5,35 5,5 6 6,5	4,5 5,9 6,1 7,25 7,5 7,6 8,2 8,6 8,8 9,2	7,2 7,8 8 8,25 8,55 8,55 8,6 8,8 9,2	8,9 8,9 9 9,6 9,7 10,2 10,6	9,6 9,8 10,3 10,55 10,85 11,3 11,4	6,8 7,5 7,6 7,8 8,5
Moyenne des résultats	1,65	3,45	5,22	6,72	8,32	9,56	10,55	7,65
Ecart à la moyenne pour un intervalle de sécurité de 95 %		0,348	0,57	1,17	0,455	0,637	0,65	0,76

Le tableau XXVI récapitule, pour les températures de 12 et 22 °C, la moyenne des résultats obtenus dans la mesure de la quantité totale et de la quantité par unité de surface (cm^2) de *p*-cymène résorbé par la peau, en fonction du temps de contact, en précisant le nombre d'animaux mis en expérience dans chacun des lots.

La courbe (fig. 29) représentative en fonction du temps, de l'absorption du *p*-cymène par un cm^2 de peau à 22 °C, que l'on construit à partir de ces résultats, affecte entre une et soixante minutes l'aspect d'une droite dont l'équation $y = 4,23 t + 72$, indique en μg , la quantité de *p*-cymène absorbée pendant un temps exprimé en minutes.

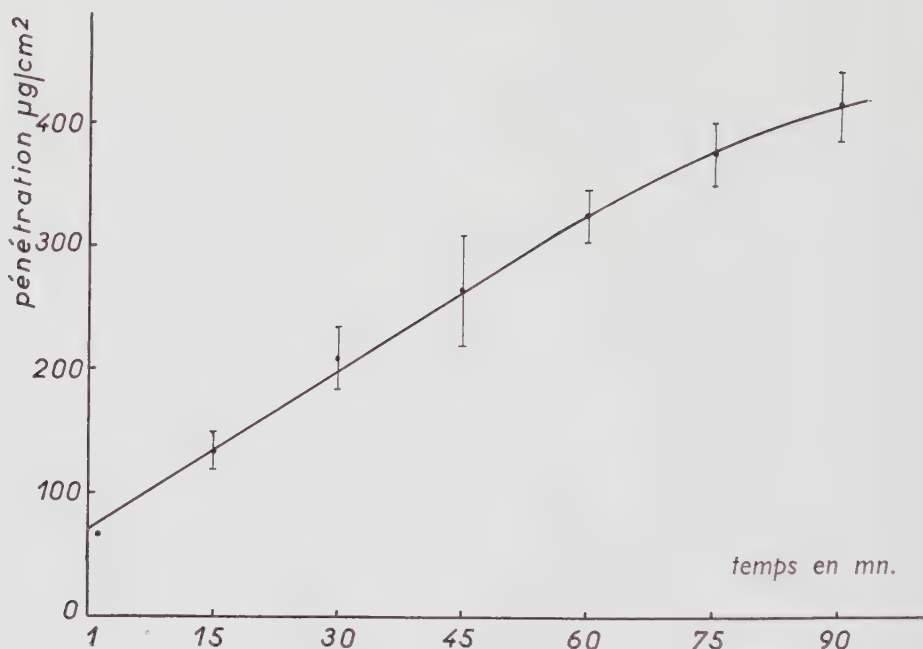


FIG. 29. — Courbe représentative de la pénétration du *p*-cymène à travers 1 cm² de peau de Souris en fonction du temps à 22° C.

TABLEAU XXVI

p-cymène absorbé à travers la peau de souris en fonction du temps

Température	Temps d'exposition en mn.	Nombre d'animaux	<i>p</i> -cymène absorbé	
			Quantité totale moyenne en µg	Quantité moyenne par cm ² en µg
22 °C	1	4	1 650	65
—	15	5	3 450 ± 348	135 ± 14
—	30	9	5 220 ± 570	205 ± 22
—	45	7	6 720 ± 1 170	264 ± 46
—	60	9	8 320 ± 455	326 ± 18
—	75	7	9 560 ± 637	375 ± 25
—	90	7	10 550 ± 650	414 ± 26
12 °C	60	5	7 650 ± 760	300 ± 30

L'analyse des résultats consignés dans le tableau XXVI, permet de constater plusieurs phénomènes.

1) L'abaissement de la température ambiante modifie peu l'absorption cutanée, puisque la quantité de *p*-cymène dosée

dans l'urine passe de 8 320 μg à 7 650 μg de 22 °C à 12 °C, soit une modification de la pénétration de 326 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{heure}$ à 300 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{heure}$. La vasoconstriction périphérique qui est supposée être intervenue à plus basse température réduit peu le processus d'absorption, ce qui confirme l'hypothèse de ROTHMAN (1954), selon laquelle les variations de la circulation au niveau de la peau n'ont qu'une influence restreinte, lorsque le débit sanguin reste capable d'entraîner toute la substance au fur et à mesure de son passage à travers la peau. Toutefois, la légère différence entre les deux chiffres ci-dessus pourrait s'expliquer par une réduction des échanges due à une augmentation de la viscosité du sébum et de l'hydrocarbure.

2) La pénétration pour un temps inférieur à une minute est très importante (65 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). Elle ne peut s'expliquer que par une adsorption immédiate qui précède le passage dans le derme, lequel se poursuit durant le maintien de l'animal dans la cage à métabolisme. En effet le *p*-cymène pourrait s'adsorber dans les couches superficielles de la peau, dont le *stratum corneum* a été comparé par GRIESEMER (1960) à une éponge capable de retenir l'eau et les substances lipophiles, ou pourrait se mélanger au sébum des appareils pilo-sébacés comme nous l'avons montré chez le Chien, ceci, malgré les précautions prises pour éliminer l'hydrocarbure en excès.

3) La pente de la courbe représentative de la pénétration en fonction du temps, montre que la vitesse de passage est constante dès les premières minutes jusqu'à une heure. Cette vitesse est de 4,23 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{minute}$, soit 254 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{heure}$. Ces faits vont à l'encontre des résultats de TREHERNE, (1956), qui a pu préciser que la vitesse de pénétration de deux solvants organiques hydrophiles, appliqués en solution aqueuse sur la peau *in vitro*, méthanol et éthanol, ne devenait constante qu'après un temps de latence de 7,75 minutes pour l'un et de 13,75 minutes pour l'autre. On peut donc supposer que pour le *p*-cymène, si cette latence existe, elle est de très courte durée.

Au-delà d'une heure d'exposition la courbe s'infléchit, soit que la quantité d'hydrocarbure au contact de la peau devienne insuffisante pour maintenir une vitesse constante de pénétration, soit que des mictions se produisent dans la boîte de contention et soustraient au dosage, une fraction des métabolites urinaires recueillis dans la cage à métabolisme, soit que, enfin, la perméabilité cutanée subisse une modification par suite du contact prolongé avec le solvant.

4) Nos résultats ne confirment pas les travaux de MEYER et KERK (1960), qui admettent une pénétration de 2 à 3 $\text{mm}^3/\text{cm}^2/\text{heure}$, soit 1 720 à 2 580 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{heure}$ pour le *p*-cymène comme, pour le benzène, le cumène et le mono et dichlorobenzène. Il faut cependant noter que ces chiffres sont calculés à partir d'expériences, dans lesquelles est mesuré le temps écoulé entre l'appli-

cation sur la peau de Souris d'ésérine base dans ces solvants et l'apparition de l'effet pharmacologique de cette dernière, ce qui revient à déterminer réellement non la vitesse de passage du solvant mais celle qui est propre à l'alkaloïde. Ces deux vitesses pourraient être indépendantes l'une de l'autre, le solvant ayant pour effet de favoriser la traversée des couches lipidiques de l'épiderme et conduisant la substance dissoute au sein de zones de résorption plus aisée.

* * *

En conclusion, l'étude quantitative de la pénétration du *p*-cymène à travers la peau de la Souris a permis de mettre en évidence une adsorption importante ($65 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) de l'hydrocarbure dans les couches superficielles de la peau dès les premières minutes de contact. La vitesse de passage à travers la barrière cutanée est d'emblée constante et reste voisine de $4,23 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{minute}$ pendant une heure. Cette vitesse ne subit pas de modifications lorsque la température extérieure passe de 22°C à 12°C .

DISCUSSION GÉNÉRALE

Le rôle protecteur de la peau est assuré par deux barrières qui y sont incluses et qui s'opposent au passage des substances étrangères dans l'organisme. La première barrière inerte, est constituée par un film continu, formé par les lipides qui imprègnent le *stratum corneum* et par le sébum qui remplit la partie supérieure des follicules avant de s'étaler à la surface de l'épiderme. L'obstacle créé par cette zone est peu important, car ses constituants, riches en cholestérol sont à la fois facilement traversés par les substances liposolubles et susceptibles de s'émulsionner lentement avec les substances hydrosolubles ou leurs solutions aqueuses. La deuxième barrière, située entre l'épiderme corné et les couches vivantes, est polarisée, chargée négativement ; elle s'oppose au passage de l'eau et des substances ionisées.

Actuellement, on tend à admettre que la pénétration cutanée se fait à la fois, à travers les formations pilo-sébacées et à travers l'épiderme, bien que dans ce dernier cas, le fait n'ait été prouvé que pour quelques molécules. On peut penser que le transfert s'effectue de préférence par l'une ou l'autre voie selon les propriétés physicochimiques du composé appliqué sur la peau (BARR, 1962). Les substances lipophiles et les gaz passeraient à travers l'épiderme et les follicules pileux, alors que, l'eau et les électrolytes migreraient très lentement dans les formations pilosébacées (MALKINSON, 1960 b). Bien que, TREGGAR (1962) considère que la pénétration cutanée soit un processus physique indépendant de l'activité métabolique et que les faits expérimentaux soient très rares pour le confirmer, il semble que les cellules vivantes interviennent dans les phénomènes de l'absorption.

La liposolubilité des substances conditionne avant tout la pénétration, mais cette propriété n'est pas suffisante et, si l'hydrosolubilité est considérée par différents auteurs comme indispensable (LAUG, 1946), la viscosité élevée des composés lipophiles de haut poids moléculaire, apparaît pour certains comme un facteur limitant (VALETTE, 1954).

Les solvants organiques se sont révélés d'excellents adjuvants de pénétration pour les substances qu'ils tiennent en solution, soit qu'ils favorisent simplement l'absorption en amenant les molécules dissoutes jusqu'aux zones de passage, soit qu'ils accompagnent celles-ci dans l'organisme suivant des modalités encore mal définies.

Ces considérations nous ont donc amenés à étudier quelques-uns des aspects mal connus de la perméabilité cutanée à l'aide d'une substance lipophile volatile, le *p*-cymène qui s'est par ailleurs révélé, à la suite des travaux de VALETTE, un bon adjuvant de pénétration pour de nombreux médicaments.

Afin de respecter autant que possible les conditions physiologiques normales et de détecter cet hydrocarbure de manière directe, nous avons d'une part, toujours opéré sur l'animal vivant, bien qu'il soit plus difficile dans ces conditions d'effectuer des mesures précises et, d'autre part, utilisé une molécule marquée au carbone 14, le *p*-cymène¹⁴C-7, ce composé peu réactif ne pouvant être décelé directement par d'autres méthodes.

Nous avons d'abord effectué une série de recherches qualitatives par autoradiographie. Elles ont commencé par une étude des voies de passage du *p*-cymène à travers la peau de diverses espèces animales. Ces expériences ont montré que l'absorption du composé marqué est importante (Souris). Chez le Chien, l'hydrocarbure se localise à la surface de l'épiderme, dans les glandes sébacées et dans la partie supérieure des follicules pileux jusqu'au niveau de la gaine épithéliale interne. On note une forte concentration radioactive dans les graisses de l'hypoderme. Dans la peau de l'oreille du Lapin, les localisations sont identiques, mais il semble y avoir une imprégnation de toute la masse épidermique, sans que l'hypoderme, peu développé et dépourvu de formations adipeuses ne fixe de radioactivité. La présence de follicules pileux dans la plupart des peaux, rendant difficile l'appréciation distincte des rôles respectifs de ces formations et de l'épiderme, nous avons choisi comme sujet d'expérience une peau glabre. Celle du Rat nouveau-né est assimilable à un épiderme continu. Nous avons pu constater que ce revêtement cutané particulier était traversé de manière diffuse et que le composé marqué se localisait dans l'hypoderme dépourvu de panicules adipeux et dans les organes de l'animal.

Afin de préciser le mécanisme de la pénétration cutanée du *p*-cymène, nous avons comparé celle-ci à l'absorption à travers d'autres barrières physiologiques chez la Souris. Il a été possible de montrer que la vitesse de diffusion à travers les poumons est extrêmement rapide (4,1 mg en 10 minutes) et que la traversée de la barrière hématoencéphalique est immédiate et réversible. En effet dès la suppression de l'apport de l'hydrocarbure par voie sanguine, le composé marqué quitte le cerveau. Par contre, la barrière placentaire n'est pas perméable dans les conditions expérimentales décrites, bien que les métabolites hydrosolubles soient décelés dans les fœtus. Ces faits nous ont permis de rapprocher les structures pulmonaires et hématoencéphaliques, pratiquement réduites à un épithélium et à une membrane de nature lipidique facilement traversés et d'autre part, la peau et la membrane placentaire qui comprennent plusieurs surfaces d'échange successives, responsables d'un ralentissement des processus d'absorption.

Nous avons recherché, à l'aide de diverses substances lipophiles, les propriétés qui conditionnent l'absorption percutanée et essayé de voir dans quelle mesure, le *p*-cymène facilite la pénétration des substances qui lui sont incorporées. Chez la Souris, nous avons montré qu'un hydrocarbure de poids moléculaire et de viscosité élevée (le squalane) traverse difficilement la peau, par contre, l'introduction d'un groupement carboxylique sur la molécule du *p*-cymène n'empêche pas la pénétration lorsque l'acide obtenu (acide cuminique) est dissous dans le *p*-cymène.

Le *p*-cymène facilite la pénétration cutanée de l'iode mais il n'augmente pas de façon sensible l'absorption du squalane.

Cet ensemble de résultats a été complété par une série de mesures quantitatives que nous n'avons pu envisager qu'après l'étude du métabolisme du composé marqué. Le *p*-cymène administré à la Souris présente une affinité pour les organes riches en lipides et pour le foie. Il est dégradé par le tissu hépatique *in vitro* et *in vivo* en dérivés hydrosolubles dont le principal est l'acide cuminique (acide *p*-isopropylbenzoïque) qui est entièrement excrété par l'urine, après avoir subi un cycle entéro-hépatique. Il n'existe pas d'élimination pulmonaire du *p*-cymène qui soit appréciable et l'air expiré ne contient pas de gaz carbonique radioactif.

Ces différentes constatations nous ont permis de poursuivre notre analyse.

Premièrement, nous avons recherché les modalités de la résorption sanguine et lymphatique du *p*-cymène qui a traversé les couches cutanées superficielles. Chez le Lapin, le sang qui irrigue l'oreille sur laquelle est appliqué l'hydrocarbure, transporte une radioactivité, qui, exprimée en *p*-cymène, représente une absorption cutanée comprise entre 120 et 500 μg de substance pour une surface de 4 à 6 cm^2 en une demi-heure. La concentration de l'hydrocarbure, faible dans les leucocytes, est une fois et demie à deux fois plus élevée dans les hématies que dans le plasma, mais chez chaque animal, la quantité totale est sensiblement égale pour les deux fractions par suite de la valeur des hématocrites. Le sang transporte une faible quantité de radioactivité fixe, localisée surtout dans le plasma ; nous n'avons pas pu en déterminer exactement l'origine.

L'importance de la résorption lymphatique a été estimée de manière indirecte chez le Rat. En effet, nous avons comparé la concentration radioactive du ganglion poplité, placé sur le passage d'une partie des canaux qui irriguent une des pattes postérieures, exposée au *p*-cymène à la concentration du carbone 14 dans l'autre patte qui n'est pas soumise au traitement. Bien que la radioactivité des ganglions, exprimée en *p*-cymène soit quatre fois plus élevée que celle du sang, il n'existe pas de différence, entre les teneurs en *p*-cymène du ganglion de la patte traitée et de la patte témoin. Les résultats sont identiques, lorsqu'on les rapporte au poids de chaque ganglion (0,67 et 0,68 μg) ou à un gramme de substance ganglionnaire (127 et 133 μg de *p*-cymène par gramme).

Deuxièmement, nous avons déterminé globalement l'importance de l'absorption percutanée du *p*-cymène chez la Souris par la mesure de l'excrétion urinaire de la radioactivité. Nous avons ainsi pu montrer, que l'hydrocarbure est fortement adsorbé à la surface de la peau ($65 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), que la vitesse de passage est d'emblée constante et qu'elle reste voisine de $4,23 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{minute}$ pendant une heure. Cette vitesse n'est pas modifiée lorsque la température extérieure passe de 22°C à 12°C .

Au terme de cette étude, il est possible de dégager un schéma synthétique des modalités de la pénétration cutanée du *p*-cymène, illustré par la figure 30. Il faut remarquer également que les recherches que nous avons poursuivies soulèvent certains problèmes qu'il conviendra d'aborder.

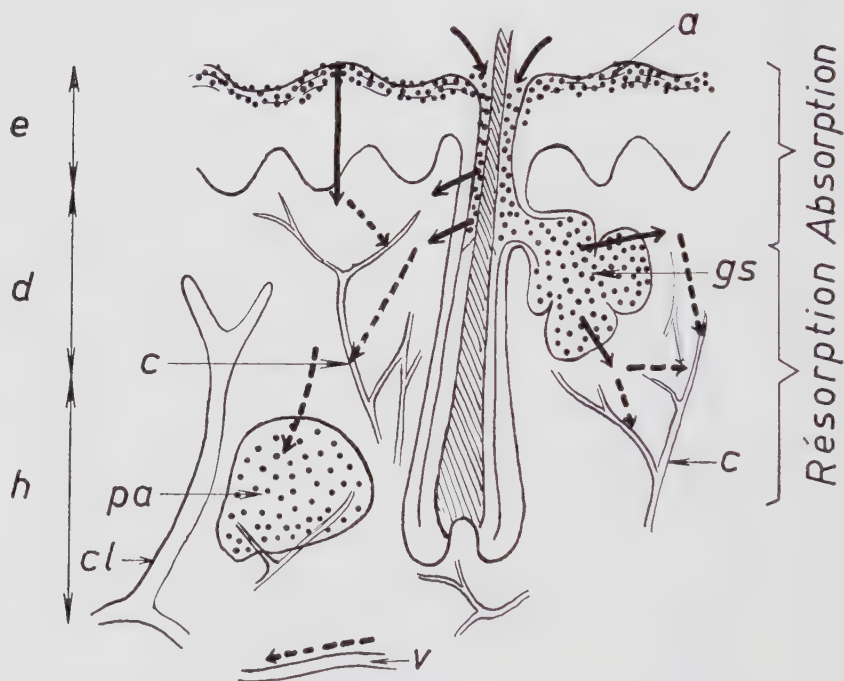


FIG. 30. — Schéma synthétique des modalités de la pénétration du *p*-cymène à travers la peau.

—→ Absorption.

---→ Résorption sanguine.

●●● Zones de concentration du *p*-cymène.

a : *p*-cymène adsorbé à la surface de la peau, *c* : capillaires, *cl* : canal lymphatique, *d* : derme, *e* : épiderme, *gs* : glande sébacée, *h* : hypoderme, *pa* : pannicule adipeux, *v* : veine.

Il nous semble que l'absorption du *p*-cymène se fait en deux phases, une phase de pénétration à travers l'épiderme et les appa-

reils pilo-sébacés jusqu'au derme, puis une phase de résorption sanguine.

La première phase est précédée d'une adsorption importante de la molécule dans les formations lipidiques de la peau qui maintient une forte concentration de *p*-cymène au-dessus des cellules vivantes et favorise le passage dans le derme. La traversée s'effectue, au niveau de la couche de Malpighi, des couches basales des glandes sébacées et des assises cellulaires de la partie supérieure des follicules pileux.

La deuxième phase est une résorption sanguine, qui résulte d'une diffusion de l'hydrocarbure à travers les capillaires. La substance marquée se répartit également dans les hématies et le plasma en se fixant sur leurs constituants lipidiques, puis elle est distribué dans les organes selon leur teneur en lipides ou leur activité métabolique.

Le *p*-cymène, malgré son insolubilité dans l'eau est capable, grâce à sa liposolubilité et à sa faible viscosité, de pénétrer rapidement à travers la peau. Il est susceptible d'accélérer la vitesse de passage des substances absorbables, mais il ne peut entraîner les composés non pénétrants.

Nous allons essayer de confronter cette interprétation de l'absorption d'une substance lipophile avec nos connaissances actuelles sur la perméabilité cutanée. Nous analyserons successivement, les voies de passage, les facteurs de pénétration du *p*-cymène à travers la peau, la résorption au niveau du derme, et enfin la cinétique de l'absorption.

Il faut remarquer au préalable que certaines contradictions avec les travaux antérieurs, peuvent s'expliquer, par le fait que nos expériences ont été effectuées avec une molécule marquée qui permet de suivre avec certitude, grâce à son identification, le composé dans la peau et l'organisme, alors que, jusqu'à présent, les recherches n'avaient pu être poursuivies pour les substances difficilement dosables que d'une manière indirecte, en incorporant par exemple, des substances étrangères faciles à détecter aux composés dont on voulait suivre le cheminement. Dans de tels procédés, il était nécessaire de supposer que le traceur et le solvant restaient liés au cours de la pénétration, ce qui est rarement le cas. De plus, le fait pour nous d'opérer sur l'animal vivant, rend difficile la comparaison, avec les nombreux résultats obtenus sur la peau en survie, qui, tout en étant plus précis, ne rendent pas compte de l'ensemble des phénomènes de l'absorption.

I. — VOIES DE PASSAGE

Un premier problème soulevé par ce travail, est celui du respect de l'intégrité cutanée par le *p*-cymène. Différents solvants organiques ont un effet irritant sur la peau (SCHUTZ, 1960). ROTHMAN

(1943) pense que ceux-ci augmentent la perméabilité cutanée par dissolution des constituants lipidiques de la membrane cellulaire vivante, qui est ainsi détruite. Il peut y avoir également une simple dissolution des lipides superficiels de la peau (sébum et lipides du stratum corneum) qui favorise le transfert des substances jusqu'au niveau des zones de passage dont l'intégrité est respectée. Il semble en fait que les deux phénomènes interviennent. En effet, BLANK et GOULD (1961 a) ont montré que le dodécylsulfate de sodium ne pénétrait pas dans le derme de peau normale humaine excisée, même lorsque la surface de la peau avait été lavée pendant 3 minutes avec de l'acétone, de l'alcool ou un mélange éthéro-alcoolique. Par contre un traitement prolongé pendant 3 jours par ces solvants, rend la peau perméable à l'agent tensio-actif. On peut conclure que pour des temps de contact courts, les solvants pénètrent sans détruire les membranes ; lorsque l'exposition est prolongée, l'altération des constituants lipidoprotidiques produit si l'expérience est effectuée *in vivo*, une nécrose des tissus superficiels. Nous avons constaté ce phénomène chez la Souris après plus de 2 heures d'application du *p*-cymène. Dans ces conditions, le tissu sous-cutané est en contact direct avec la substance pénétrante et l'absorption se réduit à la diffusion dans le derme et à la résorption sanguine.

Les résultats obtenus chez les animaux étudiés, permettent de penser comme MALKINSON (1960), que la pénétration des substances lipophiles et en particulier du *p*-cymène se fait à la fois à travers les appareils pilosébacés et à travers l'épiderme. Nous confirmons ainsi les premières études autoradiographiques de SCOTT et KALZ (1956) avec l'hydrocortisone ^{14}C appliquée sur la peau humaine et les mesures quantitatives de TREGGAR (1961) avec le tributylphosphate ^{32}P déposé sur la peau de porc. Ces études, conduites *in vivo*, ont permis de prouver une traversée importante de l'épiderme. Il semble donc que la paroi des glandes sébacées et des follicules pileux, longtemps considérée comme les seules voies de pénétration, ne participent qu'en partie à l'absorption et cela d'autant plus que la pilosité est plus développée. Par contre les substances hydrosolubles, incapables de traverser la barrière polarisée de REIN, située dans l'épiderme, emprunteraient les annexes de la peau. Cela a été montré pour divers colorants, sulfamides et sels de métaux lourds (MAC-KEE, SULZBERGER, HERMANN et BAER, 1945).

Nous avons interprété comme des zones de passage les lieux de concentration du *p*-cymène dans la peau. Ces zones sont identiques quel que soit le temps d'exposition à l'hydrocarbure. Pourtant, cette interprétation n'est pas à l'abri de critiques, car on peut admettre que les régions dépourvues de radioactivité pourraient être des lieux de passage, sans que le composé marqué s'y concentre. La papille des poils, qui n'est jamais radioactive, mais présente à son niveau une seule assise germinative peu résistante à la pénétration, pourrait en être un exemple. Dans ce cas, il y aurait lieu

de distinguer dans les différentes régions de l'appareil pilo-sébacé, des lieux de transport où la radioactivité est inapparente et le passage rapide et des lieux de concentration où la radioactivité est visible et à partir desquels s'opère un transfert lent et prolongé dans les tissus sous-jacents. Nous estimons néanmoins que notre interprétation est exacte, car une pénétration importante du *p*-cymène nécessite comme nous l'avons vu en étudiant diverses barrières physiologiques, un fort gradient de concentration entre le milieu extérieur et l'organisme. Ce gradient n'est rencontré que dans les régions riches en lipides et n'existe pas au fond des follicules pileux qui sont dépourvus de substances lipidiques.

2. — FACTEURS PHYSIQUES DE LA PÉNÉTRATION

Par l'étude de la pénétration de divers composés lipophiles, nous avons confirmé que la liposolubilité n'est pas un facteur suffisant pour entraîner l'absorption d'une molécule. Parmi les autres conditions, nous avons vu le rôle négligeable de l'hydrosolubilité, car la création sur la molécule de *p*-cymène d'une fonction polaire (carboxyle) par oxydation conduit à l'acide cuminique qui se montre aussi pénétrant que l'hydrocarbure. Par contre, après les essais avec le squalane, nous arrivons aux mêmes conclusions que VALETTE, CAVIER et SAVEL (1954) : l'augmentation de la viscosité qui accompagne l'accroissement du poids moléculaire dans une même série chimique, vient interférer avec la liposolubilité et diminue le pouvoir pénétrant.

Comme ROTHMAN et FLESCH (1944) et VALETTE (1954), nous avons constaté qu'un excipient était susceptible d'augmenter l'absorption d'une substance qui traverse la peau (Iode), mais qu'il ne peut améliorer le passage d'un composé pour lequel l'épiderme est peu perméable (Squalane).

3. — RÉSORPTION SANGUINE

Après la traversée de l'épiderme, le *p*-cymène se répartit dans le derme, d'où il est immédiatement résorbé par le torrent circulatoire.

La résorption se fait essentiellement par voie sanguine, la lymphe n'interviendrait pas dans ce phénomène. Pourtant, un rôle secondaire de la voie lymphatique n'est pas à exclure, car notre étude a été indirecte et l'animal privé de mouvements pendant l'application de l'hydrocarbure. Il se peut que des contractions musculaires ou des massages qui favorisent l'absorption entraînent un transport lymphatique non négligeable. Néanmoins, dans les

conditions normales, nous pensons comme GRIESEMER (1960) que ce sont surtout les grosses molécules qui sont résorbées par la lymphe.

La traversée des capillaires sanguins par le *p*-cymène est instantanée et semble se faire par diffusion, comme dans le cas de l'absorption à travers les barrières pulmonaires et hématoencéphaliques. Ces barrières se comportent comme des membranes lipidiques qui n'opposent aucune résistance à la pénétration d'un composé liposoluble. La vitesse de diffusion dans ces conditions ne dépend que du gradient de concentration entre les deux faces de la surface d'échange. Dans le cas des capillaires sanguins, ce gradient est élevé puisque le sang qui irrigue la peau est continuellement renouvelé. Après la traversée des capillaires, le *p*-cymène se répartit dans les formations lipidiques du sang. On pourrait envisager un autre mécanisme, tel que, la migration des lipomicros du derme, chargés de *p*-cymène à travers les capillaires. Mais il nous semble que ce mode d'absorption serait moins rapide que celui que nous constatons.

Le fait que le *p*-cymène qui est totalement insoluble dans l'eau, soit facilement résorbé par le sang, est à opposer à la théorie de LAUG (1946) pour qui la pénétration rapide d'une substance à travers la peau nécessite qu'elle soit à la fois liposoluble et hydrosoluble, l'hydrosolubilité favorisant la traversée des formations hydrophiles de la peau et, en particulier le passage dans le sang (MEYER, KERK et MEYER, 1960). Dans le cas du *p*-cymène et des hydrocarbures, cette propriété n'est pas nécessaire et pour de nombreuses substances, les lipoprotéines et les lipomicros répartis dans les milieux aqueux de l'organisme doivent être capables d'assurer le transport des composés non hydrosolubles.

La plus forte concentration du *p*-cymène dans les hématies que dans le plasma ne peut s'expliquer, ni par la différence de la teneur en lipides de ces deux fractions, puisque le plasma contient autant de lipides que les globules (5,3 g et 6,0 g pour 1 000 chez l'homme) (SPECTOR, 1956), ni par l'activité métabolique des hématies à l'égard du *p*-cymène, puisque celles-ci ne dégradent pas l'hydrocarbure. L'affinité particulière des hématies pour les solvants serait peut-être consécutive à une fixation sur la trame lipoprotidique du stroma.

4. — CINÉTIQUE DE L'ABSORPTION

L'étude quantitative directe de la pénétration des solvants à travers la peau, n'a donné lieu qu'à un très petit nombre de travaux, faute de moyens d'investigation.

Parmi les études indirectes, nous avons vu que les conclusions de MEYER et KERK (1960) qui estiment la pénétration de divers solvants très pénétrants : benzène, cumène, *p*-cymène, mono et

dichlorobenzène à partir de la mesure de l'absorption d'une substance active qui y est incorporée, n'étaient pas justifiées et dépassaient de dix fois nos mesures.

Les premières déterminations directes de la pénétration ont consisté dans la mesure de l'élimination des solvants ou de leurs dérivés dans divers émonctoirs, mais ceux-ci ne participent en général qu'à l'excrétion d'une fraction du composé. Pourtant VALDIGUIE et MESTRE (1944) ont prouvé en la détectant dans l'urine, que l'acétone traversait la barrière cutanée. De même, le fait que de nombreux solvants soient partiellement éliminés par voie pulmonaire, a permis à LAZAREW, BRUSIŁOWSKAJA, LAWROW et LIPSCHITZ (1931) d'estimer l'absorption du benzène à travers la peau de la Souris et du Lapin par analyse de l'air expiré et à BEAMER, MAC COLLISTER, ATCHISON et SPENCER (1950) d'apprécier la pénétration du tétrachlorure de carbone ^{14}C chez le Singe.

Malgré leurs qualités, ces méthodes sont incomplètes, car elles ne permettent pas de mesurer quantitativement l'absorption totale.

TRÉHERNE (1956) a déterminé globalement sur la peau de Lapin *in vitro*, la pénétration du méthanol ^{14}C dissous dans l'eau et trouvé une vitesse comprise entre 9 et 11 $\mu\text{Mole}/\text{cm}^2/\text{heure}$. Lorsque l'épiderme est supprimé, cette valeur passe à 400 $\mu\text{Mole}/\text{cm}^2/\text{heure}$. Le taux d'absorption de l'éthanol, de l'iodure d'éthyle et du glycérol mesuré dans les mêmes conditions a été trouvé plus faible que celui de l'alcool méthylique. D'autres auteurs (TRÉGEAR, 1960, AINSWORTH, 1960) ont comparé la pénétration du tributylphosphate ^{32}P chez divers animaux dans différentes conditions expérimentales. Les résultats trouvés sont très variables selon l'espèce animale, mais assez constants pour un même animal par les quatre techniques proposées (tableau XXVII). Enfin MARZULLI

TABLEAU XXVII

Comparaison de la vitesse de pénétration du tributylphosphate à travers la peau. Mesure par différentes techniques (1)

Technique	Rat		Lapin		Porc	
	$\mu\text{g}/\text{cm}^2$ par mn	$\mu\text{M}/\text{cm}^2$ par heure	$\mu\text{g}/\text{cm}^2$ par mn	$\mu\text{M}/\text{cm}^2$ par heure	$\mu\text{g}/\text{cm}^2$ par mn	$\mu\text{M}/\text{cm}^2$ par heure
Peau excisée ...	0,8	17,5	1,6	35	0,16	3,5
Peau perfusée...			1,7	37,5	0,15	3,3
Peau intacte (disparition de la surface).....	0,7	15,5	2,3	50,5	0,13	2,85
Peau intacte (absorption globale)			2	44		

(1) Les résultats exprimés en $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ sont tirés d'un mémoire de AINSWORTH 1960 et les valeurs exprimées en $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ sont calculées à partir de ces derniers.

et TRÉGEAR (1961) ont précisé que la vitesse de pénétration du tripropylphosphate ^{32}P à travers la peau de poitrine humaine, *in vitro*, était égale à $0,4 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{mn}$, soit $10,5 \mu\text{Mole}/\text{cm}^2/\text{heure}$.

La comparaison de ces chiffres à nos propres résultats est pratiquement impossible. Toutefois nous voyons que la vitesse de pénétration du *p*-cymène chez la Souris, *in vitro*, qui est de $254 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{heure}$ ($190 \mu\text{M}/\text{cm}^2/\text{heure}$) est très supérieure à la vitesse de passage des solvants que nous avons passée en revue. Il semble donc que l'action favorisante du *p*-cymène sur la pénétration des substances qui y sont dissoutes est en partie consécutif à son haut pouvoir de pénétration.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Le but de ce travail a été d'analyser quelques-uns des aspects peu connus de la perméabilité de la peau, à l'égard des substances lipophiles, à l'aide d'un hydrocarbure, le *p*-cymène marqué au carbone 14.

Les propriétés de la peau en font un revêtement de protection. Pourtant, elle est capable d'absorber de nombreuses substances minérales et organiques. Mais les modalités de la traversée de la peau sont mal connues et, si l'on y a caractérisé une structure polarisée qui s'oppose à l'absorption de l'eau et des électrolytes, on admet depuis quelques années, que les appareils pilosébacés ne sont pas la seule voie de pénétration des substances absorbables et que l'épiderme y participe également.

L'absorption est conditionnée par les propriétés physiques des composés chimiques et notamment leur liposolubilité ; pourtant ce critère n'est pas suffisant et divers auteurs soutiennent qu'une certaine hydrosolubilité est nécessaire, tandis que d'autres pensent qu'une forte viscosité empêche la pénétration et s'oppose ainsi à l'action favorable de la lipophilie.

L'adjonction de solvants modifie les conditions de l'absorption qui peut être accrue suivant un processus mal défini et rarement analysé de façon quantitative.

Ces différentes incertitudes nous ont conduit à reprendre ce problème sur la peau de l'animal vivant, afin de rester dans des conditions physiologiques et de voir l'ensemble du phénomène, en faisant appel, comme moyen d'étude, au *p*-cymène marqué au carbone 14 qui est directement détectable dans l'organisme.

Après une mise au point des résultats obtenus par les précédents auteurs sur la pénétration cutanée, traitant en particulier des faits observés à l'aide des radioisotopes, nous décrivons les méthodes que nous avons utilisées pour détecter le carbone 14 du *p*-cymène. Ces méthodes comprennent l'aspect qualitatif du problème avec l'autoradiographie et l'aspect quantitatif avec l'extraction et la minéralisation des composés en vue d'une mesure.

L'étude autoradiographique de la pénétration cutanée chez différentes espèces animales, a montré que le *p*-cymène est absorbé à la fois au niveau des appareils pilosébacés et de l'épiderme. Chez le Chien, le composé marqué se concentre dans les follicules pileux, entre le poil et la gaine épithéliale externe jusqu'au niveau

de la gaine épithéliale interne, dans les glandes sébacées et leurs conduits excréteurs. Chez le Lapin, la répartition est identique, mais il y a également une imprégnation diffuse de l'épiderme dont le rôle a pu être prouvé chez le Rat nouveau-né qui est dépourvu de poils et de follicules pileux développés. En effet, le composé marqué traverse directement l'épiderme de cet animal. Le *p*-cymène qui possède une forte affinité pour les lipides, diffuse à travers les formations lipidiques de la peau, pour atteindre les cellules vivantes où s'effectue l'absorption, il est alors entraîné dans l'organisme par les liquides circulants.

Afin de préciser ces résultats, nous avons comparé par autoradiographie, la pénétration cutanée et l'absorption à travers d'autres membranes physiologiques de la Souris. Les poumons et la barrière hématoencéphalique se comportent comme des membranes lipidiques qui ne s'opposent pas à la pénétration du *p*-cymène. Celui-ci diffuse rapidement (4,1 mg de *p*-cymène sont absorbés par voie pulmonaire en dix minutes) et de façon réversible; car, d'une part, une très faible fraction de l'hydrocarbure est éliminée par voie pulmonaire, d'autre part ce composé quitte le tissu nerveux dès que la concentration sanguine devient inférieure à celle du cerveau. La vitesse de pénétration est plus lente à travers la peau, elle est nulle à travers la barrière placentaire dans les conditions décrites. Il semble en comparant les structures de ces différentes formations, que le flux de l'hydrocarbure à travers ces membranes est fonction de leur épaisseur, de leur nombre et du gradient de concentration de part et d'autre de celles-ci.

Nous avons enfin comparé qualitativement la pénétration du *p*-cymène et d'autres substances lipophiles chez la Souris. L'addition d'un groupement hydrophile sur la molécule de *p*-cymène (acide cuminique) ne modifie pas les propriétés pénétrantes. Par contre, l'augmentation du poids moléculaire des hydrocarbures, qui conduit à des substances de viscosité élevée (squalane) est défavorable. Le *p*-cymène utilisé comme véhicule favorise l'absorption de l'iode, mais il n'augmente pas la pénétration du squalane.

Ces recherches ont été suivies de différentes mesures quantitatives qui n'ont pu être entreprises qu'après l'analyse du métabolisme du *p*-cymène. L'hydrocarbure administré à la Souris présente une forte affinité pour les lipides et le foie. Il est dégradé par le tissu hépatique en composés hydrosolubles qui sont entièrement éliminés par voie urinaire et dont le principal est l'acide cuminique. Nous avons vérifié l'absence d'élimination fécale et pulmonaire appréciable.

Nous avons, en outre, recherché les modalités de la résorption du *p*-cymène. L'étude du sang qui s'écoule des veines de l'oreille du Lapin sur la peau de laquelle est appliqué le solvant, montre que la quantité résorbée est comprise entre 50 et 200 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{heure}$. La concentration de l'hydrocarbure est 1,6 à 2 fois plus élevée dans les hématies que dans le plasma, toutefois, la quantité totale

transportée par chacune des fractions est identique du fait de la valeur des hématocrites. Le plasma est donc capable de dissoudre et de transporter une substance lipophile insoluble dans l'eau. Nous avons apprécié le rôle de la lymphe de manière indirecte en comparant la teneur en carbone 14 du ganglion poplité, placé sur le parcours des vaisseaux qui irriguent une région cutanée (patte postérieure du Rat) exposée au *p*-cymène à la teneur du même ganglion de la patte non soumise au traitement. Les résultats rapportés à la masse du ganglion ou à un gramme de substance ganglionnaire ne diffère pas entre eux.

Enfin, il a été possible de mesurer directement le taux de pénétration du *p*-cymène à travers la peau de la Souris, en suivant l'élimination des métabolites urinaires. Dès les premières minutes, une adsorption importante est observée ($65 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). La vitesse d'absorption est d'emblée constante pendant une heure, elle est égale à $4,23 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{mn}$. Cette vitesse n'est pas modifiée lorsque la température extérieure passe de 22°C à 12°C .

Ces différentes expériences nous ont permis de tirer quelques conclusions :

1) Nos résultats mettent en évidence deux phases dans la pénétration cutanée du *p*-cymène : absorption épidermique et résorption sanguine. La première phase comporte la traversée de l'épiderme, suivie de la répartition de l'hydrocarbure dans le derme. Au cours de ce processus, le *p*-cymène est adsorbé dans les formations lipidiques de la couche cornée et des appareils pilosébacés, il diffuse jusqu'aux cellules vivantes et pénètre à la fois au niveau des assises germinatives, des glandes sébacées, de la partie supérieure des follicules pileux et de l'épiderme. Toutefois nous n'avons pas pu saisir les phénomènes qui se déroulent pendant la traversée des cellules vivantes. La deuxième phase est une résorption sanguine de la molécule répartie dans le derme. Le *p*-cymène diffuse à travers les parois des capillaires. Il se concentre une fois et demi à deux fois plus dans les hématies que dans le plasma, puis il est distribué dans les organes selon leur teneur en lipides ou leur activité métabolique (foie).

2) Les barrières pulmonaire et hématoencéphalique sont perméables au *p*-cymène et se comportent comme des membranes de nature lipidique. Par contre, la barrière placentaire n'est pas traversée par la molécule, ce qui semble en relation avec l'existence d'un faible gradient de concentration au niveau d'une structure qui comporte plusieurs surfaces d'échange successives.

3) Le *p*-cymène est un adjuvant de la pénétration des substances absorbables. Il favorise l'absorption de celles-ci, peut-être en détruisant les constituants lipidiques de la peau, mais surtout en entraînant les molécules qui y sont dissoutes jusqu'aux zones de pénétration où l'absorption s'effectue, selon un rythme propre à chacun des constituants de la solution.

4) La vitesse de la pénétration du *p*-cymène à travers la peau

de la Souris a été mesurée directement et trouvée constante pendant une heure ($4,23 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{mn}$) à 12 et 22 °C.

5) Le fait que le *p*-cymène, non hydrosoluble soit absorbé en quantité importante, puis véhiculé par le sang, permet de penser que l'hydrosolubilité n'est pas un facteur nécessaire à l'absorption des hydrocarbures et, que les lipoprotéines des tissus et du sang sont capables d'assurer son transport à partir du point d'application. Au contraire, la faible viscosité du *p*-cymène est un facteur favorable à sa rapide diffusion; nous avons vu qu'un hydrocarbure de poids moléculaire et de viscosité élevée, le squalane, ne traversait pas la peau en quantité pondérable.

6) Le *p*-cymène est dégradé dans l'organisme par le foie en dérivés hydrosolubles. Le principal métabolite est l'acide *p*-isopropylbenzoïque (acide cuminique) que nous avons caractérisé. Il subit un cycle entérohépatique qui aboutit à une élimination urinaire exclusive.

Les résultats fournis par l'étude de la perméabilité cutanée à l'aide du *p*-cymène ont apporté quelques faits nouveaux. Il a été possible de préciser, premièrement, chez différents animaux les voies de passage à travers la peau et de mettre en évidence une traversée épidermique, deuxièmement, de montrer que le *p*-cymène insoluble dans l'eau est résorbé en quantité importante par le sang et transporté à la fois par les hématies et le plasma, enfin de mesurer quantitativement de manière directe la vitesse de l'absorption de l'hydrocarbure à travers la peau de la Souris.

De nombreux problèmes restent à élucider, car l'absorption cutanée n'est pas un processus exclusivement physique et la perméabilité des cellules vivantes des assises germinatives que nous n'avons pas pu analyser, joue probablement un rôle prépondérant. Nous espérons néanmoins que ce travail présente quelque intérêt en vue de recherches ultérieures.

BIBLIOGRAPHIE

Les noms des périodiques cités ont été abrégés selon le World List of Scientific Periodicals published in the years 1900-1950. Butterworths Scientific Publications, London, 1952.

- ADACHI K., CHOW D. C. — A new simplified method for perfusing dog skin. *J. Invest. Derm.*, 1962, *39*, p. 299-302.
- AINSWORTH M. — Methods for measuring percutaneous absorption. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 1960, *11*, p. 69-78.
- ANTONY D. S., LONG M. V. — Analyses for total and isotopic carbon in intermediary metabolism studies. 1952, *Rapport ORNL 1303* (microcarte de la bibliothèque du CEN de Saclay).
- APELGOT S., MARS S. — A propos du dosage quantitatif du carbone. *C. R. Soc. Biol., Paris*, 1953, *35*, p. 691-693.
- ARONOFF S. — Techniques of radiobiochemistry. *The Iowa State College Press*, Ames, Iowa, USA, 1956.
- AXELROD D. J., HAMILTON J. G. — Radioautographic studies of the distribution of Lewisite and mustard gas in skin and eye tissues. *Amer. J. Path.*, 1947, *23*, p. 389-411.
- BARKER H. A. — *Communication personnelle* in CALVIN et coll. 1949, p. 93.
- BARR M. — Percutaneous absorption. *J. Pharm. Sci.*, 1962, *51*, p. 395-409.
- BEAMER W. H., MAC COLLISTER D. D., ATCHISON G. J., SPENCER H. C. — Studies with low vapor concentrations of carbon tetrachloride labeled with C^{14} . II Absorption with elimination upon skin exposure of monkeys. *Federation Proc.*, 1950, *9*, p. 257.
- BELL C. G., HAYES F. N. — Liquid Scintillation counting. *Pergamon Press*, London, 1958.
- BETTLEY F. R., DONOGHUE E. — Effect of soap on the diffusion of water through isolated human epidermis. *Nature, Lond.*, 1960, *185*, p. 17-20.
- BETTLEY F. R. — The influence of soap on the permeability of the epidermis. *Brit. J. Derm.*, 1961, *73*, p. 448-454.
- BLANK I. H. — Factors which influence the water content of the stratum corneum. *J. Invest. Derm.*, 1952, *18*, p. 433-440.
- BLANK I. H., SHAPPIRIO E. B. — The water content of the stratum corneum III) Effect of previous contact with aqueous solutions of soap and detergents. *J. Invest. Derm.*, 1955, *25*, p. 391-401.
- BLANK I. H., GRIESEMER R. D., GOULD E. — The penetration of an anticholinesterase agent (Sarin) into skin. I) Penetration into intact excised skin. *J. Invest. Derm.*, 1957, *29*, p. 299-309.
- BLANK I. H., GRIESEMER R. D., GOULD E. — The penetration of an anticholinesterase agent (Sarin) into skin. II) Autoradiographic studies. *J. Invest. Derm.*, 1958, *30*, p. 187-191.
- BLANK I. H., GOULD E. — Penetration of anionic surfactants (surface active agents) into skin. I) Penetration of sodium laurate and sodium dodecyl sulfate into excised human skin. *J. Invest. Derm.*, 1959, *33*, p. 327-336.

- BLANK I. H. — Percutaneous absorption, methods of study and factors which influence absorption. *J. Occup. Med. USA*, 1960 *a*, 2, p. 6-11.
- BLANK I. H. — Percutaneous absorption, statement of problem and critical review of past methods. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 1960 *b*, 11, p. 59-68.
- BLANK I. H., GOULD E. — Penetration of anionic surfactants into skin. II) Study of mechanism which impede the penetration of synthetic anionic surfactants into skin. *J. Invest. Derm.*, 1961*a*, 38, p. 311-315.
- BLANK I. H., GOULD E. — Penetration of anionic surfactants into skin. III) Penetration from buffered laurate solutions. *J. Invest. Derm.*, 1961*b*, 37, p. 485-488.
- BLANPIN O., BRETAUDEAU J. — Influence d'un surfactif non ionique sur la pénétration percutanée du salicylate de diéthylamine. *C. R. Soc. Biol. Paris*, 1961, 155, p. 1369-1372.
- BLOCK R. J. — The composition of keratins, the amino acid composition of hair, wool, horn and other eukeratins. *J. Biol. Chem.*, 1939, 128, p. 181-186.
- BOYD G. A. — Autoradiography in biology and medicine. *Academic Press, inc. Publishers*, New York, 1955.
- BRODIE B. B. — Pathways of drug metabolism. *J. Pharm. Pharmacol.*, 1956, 8, p. 1-17.
- BRODIE B. B., GILETTE J. R., LADU B. N. — Enzymatic metabolism of drugs and other foreign compounds. *Annu. Rev. Biochem.*, 1958, 27, p. 427, 454.
- BRODIE B. B., KURZ H., SCHANKER L. S. — The importance of dissociation constant and lipid solubility in influencing the passage of drugs into the cerebrospinal fluid. *J. Pharmacol.*, 1960, 130, p. 20-25.
- BRODIE B. B. — Drug metabolism. Subcellular mechanisms. Ciba Foundation Symposium on enzymes and drug action. *J. A. Churchill Ltd*, London, 1962, p. 317-343.
- BUSELLU M. A., D'AGOSTINO O., ROSSI C. — Tecniche per la microcombustione di sostanze marcate ^{14}C , e la misura delle attività con contatore ad anidride carbonica. *Ann. Chim. Ital.*, 1959, 49, p. 1426-1435.
- BUTCHER E. O. — The hair cycle in the albino Rat. *Anal. Rec.*, 1934, 61, p. 5-19.
- BUTCHER E. O. — The penetration of fat and fatty acids into the skin of the Rat. *J. Invest. Derm.*, 1953*a*, 21, p. 43-48.
- BUTCHER E. O. — The Penetration of radioactive stearic acid into the skin of the Rat. *J. Invest. Derm.*, 1953*b*, 21, p. 243-247.
- CALVERY H. D., DRAIZE J. H., LAUG E. P. — The metabolism and permeability of normal skin. *Physiol. Rev.*, 1946, 26, p. 495-540.
- CALVIN M., HEIDELBERGER C., REID J. C., TOLBERT B. M., YANKWICH P. E. — Isotopic carbon. Techniques in its measurement and chemical manipulation. *J. Wiley and sons inc.*, New York and London, 1949 et 1960.
- CAMUS L., NICLOUX M. — Elimination du chlorure d'éthyle du sang, sa répartition entre les globules et le plasma. *C. R. Soc. Biol.*, 1907, 63, p. 792-795.
- CHASSEVANT A., GARNIER M. — Toxicité du benzène et de quelques hydrocarbures aromatiques homologues. *C. R. Soc. Biol.*, 1903, 55, p. 1255-1257.
- CHOMAN B. R. — Autoradiographic studies on percutaneous absorption. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 1960, 11, p. 138-145.
- CHRISTMAN D. R. — Choosing a method for counting soft betas. *Nucleonics*, 1961, (5), 19, p. 51-64.
- COHEN Y., DELASSUE H. — Modification de la méthode d'autoradiographie de S. ULLBERG sur coupes de Souris entières. *C. R. Soc. Biol.*, 1959, 153, p. 300-304.
- COHEN Y. — Le passage transplacentaire des médicaments. *Thérapie*, 1961 *a*, 16, p. 509-520.

- COHEN Y. — Bases expérimentales de l'emploi des colloïdes radioactifs en thérapeutique. *Produits pharmaceutiques*, 1961 *b*, 16, n° 4, p. 159-168.
- COHEN Y., WEPIERRE J. — Méthode d'étude autoradiographique de substances marquées volatiles. *Rapport CEA, Saclay*, n° 2071, 1961.
- COHEN Y., BOISSIER J., FOND DU PICARD Y. — Etude de la distribution chez la Souris d'un hypnotique marqué au carbone 14, la méthyl-2 orthotolyl-3 quinazolone-4. *Arch. Int. Pharmacodyn.*, 1962, 87, p. 271-282.
- CREDNER D. H. — Experimentelle untersuchungen zur jodaufnahme durch die Haut und Lunge beim Menschen. *Arch. Int. Pharmacodyn.*, 1954, 97, p. 363-372.
- CRONIN E., STOUGHTON R. B. — Percutaneous absorption, regional variations and the effect of hydration and epidermal stripping. *Brit. J. Derm.*, 1962 *a*, 74, p. 265-272.
- CRONIN E., STOUGHTON R. B. — Percutaneous absorption of nicotinic acid and ethylnicotinate in human skin. *Nature, Lond.*, 1962 *b*, 195, p. 1103-1104.
- CYR G. N., SKAEN D. M., CHRISTIAN J. E., LEE C. O. — A comparison of the absorption of radioactive sodium iodide from lard, wool, fat and petrolatum. *J. Amer. Pharm. Ass. (Sc. ed.)*, 1949, 38, p. 615-617.
- CZETSCH-LINDENWALD H. V. — Über die Resorption von Salbengrundlagen. *Pharmaz. Ind.*, 1943, 10, p. 29-31.
- DELONG C. W., THOMPSON R. C., KORNBERG H. A., Percutaneous absorption of tritium oxide. *Amer. J. Roentgenol.*, 1954, 71, p. 1038-1045.
- DELSA R., SOUR R. — Analyse des techniques en autoradiographie des coupes histologiques. *Rapport CEN, Bruxelles*, 1960, Blg 48, R. 1847.
- DOERING P., BARTELHEIMER E. W. — Untersuchungen zur Sulfidresorption durch die menschliche Haut mit S35. *Arzneim. Forsch*, 1960, 14, p. 567-572.
- DEUEL H. J. — The lipids, their chemistry and biochemistry (3 vol). *Interscience publishers*, New York and London, 1951.
- DOBBS J. — The blood brain barrier. *Physiol. Rev.*, 1961, 41, p. 130-188.
- DOMK N. S., BARLOW C. F., ROTH L. J. — An ontogenic study of the phenobarbital in the cat brain. *J. Pharmacol.*, 1960, 130, p. 285-293.
- EDWARDS L. J., Utilisation of topically applied methionine by the guinea pig. *Nature, Lond.*, 1954, 173, p. 1042-1043.
- ELLARD G. A., GARROD J. M. B., SCALES B., SNOW G. A. — Percutaneous absorption and routes of excretion of Ditolphal (Etusil). *Biochem. Pharmacol.*, 1963, 12, p. 271-281.
- FABRE A. — Métabolisme du benzène et du toluène. *Hermann et Cie*, Paris, 1948.
- FABRE R., ROUGIER G., Physiologie médicale. *Maloine S.A.*, Paris, 1961.
- FELDBERG W., PATTON D. M. — Release of histamine from skin and muscle in the cat by opium alkaloids and other histamine liberators. *J. Physiol. Lond.*, 1951, 114, p. 490-509.
- FUNT B. L. — Scintillation counting with organic phosphorus. *Canad. J. Chem.*, 1961, 39, p. 711-715.
- GEMMEL D. H. O., MORRISON J. C. — The release of medicinal substances from topical applications and their passage through the skin. *J. Pharm. Pharmacol.*, 1957, 9, p. 641-656.
- GERARDE H. W. — Toxicology and Biochemistry of aromatic hydrocarbons. *Elsevier monograph. Elsevier publishing Co*, Amsterdam, 1960.
- GILLETTE J. R. — Studies on mechanism of side chain oxydation. Thiopental and *p*-nitrotoluene. *J. Pharmacol.*, 1958, 122, p. 24A-25A.
- GIROUD A., BULLIARD H. — La kératinisation de l'épiderme et des phanères. *G. Doin*, Paris, 1930.

- GLASCOCK R. F. — Isotopic gas analysis for biochemists. *Academic press, inc. publishers*, New York, 1954.
- GOLDZIEHER J. W., BAKER R. E. — The percutaneous absorption of estradiol-17 β and progesterone C-14. *J. Invest. Derm.*, 1960, 35, p. 215-218.
- GRAUL E. H. — Untersuchungen über die Permeation von Thorium X in die menschliche Haut. *Strahlentherapie*, 1953, 92, p. 197-202.
- GREENE E. C. — The anatomy of the Rat. *Hafner publishing Co*, New York, 1955.
- GRENIER J. F., HATANO M., WEISS A. G. — Deshalogénéation des graisses halogénées au cours de l'absorption intestinale. Etude expérimentale chez le Chien avec la trioléine ^{131}I et l'acide oléique ^{131}I . *C. R. Soc. Biol.*, 1961, 155, p. 1709-1708.
- GRIESEMER R. D. — Biological factors affecting percutaneous absorption. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 1960, 11, p. 79-85.
- GRIESEMER R. D., BLANK I. H., GOULD E. — The penetration of an anticholinesterase agent (Sarin) into skin. III) A method for studying the rate of penetration into the skin of living Rabbit. *J. Invest. Derm.*, 1958, 31, p. 255-258.
- GUERMONT J. P., PICHAT L. — Synthèse du *p*-cymène (^{14}C)-7. *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 1959, p. 580-582.
- HADGRAFT J. W., SOMERS G. F., WILLIAMS H. S. — Percutaneous absorption with diiodofluoresceine ^{131}I . *J. Pharm. Pharmacol.*, 1956, 8, p. 1027-1033.
- HADGRAFT J. W., SOMERS G. F. — Percutaneous absorption. *J. Pharm. Pharmacol.*, 1956, 8, p. 625-634.
- HAGMULLER K. — Die Haut als Resorptionsorgan für Jod, autoradiographisch untersucht. *Wien. Med. Wschr.*, 1957, 107, p. 825-827.
- HANSON J. — The histogenesis of the epidermis in the Rat and the Mouse. *J. Anat. Lond.*, 1947, 81, p. 174-197.
- HARRIS M. — Chemistry of keratin. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 1949, 1, p. 225-230.
- HEALD P. J. — An improved procedure for the determination of carbon in organic compounds in aqueous solutions. *Biochem. J.*, 1951, 49, p. 684-685.
- HENRIQUES F. C., KISTIAKOWSKY G. B., MARGNETTI C., SCHNEIDER W. G. — Radioactive studies ; analytical procedure for measurement of long lived radioactive sulfur S-35 with a Lauritzen electroscope and comparison of electroscope with special Geiger tube. *Indust. Engng. Chem. (anal.)*, 1946, 18, p. 349-353.
- HERXHEIMER A. — The action of drugs on the skin. *Annu. Rev. Pharmacol.*, 1961, 1, p. 351-364.
- HUERRE M. — Influence de certains véhicules sur l'absorption percutanée des médicaments. *Thèse pharmacie*, Paris, 1961.
- ISLER H. — Etudes sur la résorption percutanée. *Dermatologica, Basel*, 1950, 100, p. 295-300.
- JACOBSEN O. — Über das Verhalten des Cymols im Thierkörper. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, 1879, 12, p. 1512-1518.
- JOACHIMOGLU G. — Histologische Untersuchungen über das Vermögen des Chloroform USW, in die thierische Haut einzudringen. *Pflug. Arch. Ges. Physiol.*, 1924, 206, p. 333-336.
- JOHNSTON G. W., LEE C. O. — A radioactive method of testing absorption from ointment bases. *J. Amer. Pharm. Ass. (Sc. ed.)*, 1943, 32, p. 278-280.
- KOOSMAN D. J. — Lipids of the skin : some changes in the lipids of the epidermis during process of keratinisation. *Arch. Derm. Syph. N. Y.*, 1932, 25, p. 444-450.
- KUTZIM H. — Quantitative Bestimmung der Permeation und Resorption radioactiver Substanzen durch die Haut. *Arch. Klin. Exptl. Derm.*, 1957, 206, p. 106-110.

- LANGE K., EVANS R. D. — Absorption of Radon through the skin and its exhalation through the lungs. *Radiology*, 1947, 48, p. 514-516.
- LASSEN N. A. — Cerebral blood flow oxygen consumption in man. *Physiol. Rev.*, 1959, 39, p. 183-238.
- LAUG E. P. — Permeability. *Physiol. Rev.*, 1946, 26, p. 510-533.
- LAUG E. P., VOS E. A., UMBERGER E. J., KUNZE F. M. — A method for the determination of cutaneous penetration of mercury. *J. Pharmacol.*, 1947, 89, p. 42-51.
- LAZAREW N. W., BRUSILOVSKAJA A. J., LAWROW J. N., LIFSCHITZ F. B. — Über die Durchlässigkeit der Haut für Benzin und Benzol. *Arch. Hyg. Ber.*, 1931, 106, p. 113-122.
- LEBLOND C. P., EVERETT N. B., SIMMONS B. — Sites of proteins synthesis as shown by radioautography after administration of ^{35}S labelled methionine. *Amer. J. Anat.*, 1957, 101, p. 225-272.
- LESSHAFT C. T. — The use of nonionic surfactants in the development of a hydrophilic ointment. *Dissertation*, 1960, 20, p. 4376-4377.
- LIBBY F. W. — Measurement of radioactive tracers, particularly C-14, S-35, T and other longer lived low energy activities. *Analyt. Chem.* 1947, 19, p. 2-6.
- LOBITZ W. C., DANIELS F. — Skin. *Annu. Rev. Physiol.*, 1961, 23, p. 207-228.
- LOTMAR V. R. — Über den Einfluss verschiedener pharmakologisch-chemischer Massnahmen auf die Ionendurchlässigkeit der Haut. *Arch. Phys. Therap.*, 1958, 10, p. 392-399.
- LOVEDAY D. E. — An in vitro method for studying percutaneous absorption. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 1961, 12, p. 224-239.
- MAC-KEE G. M., SULZBERGER M. B., HERRMANN F., BAER R. L. — Histologic studies on percutaneous penetration with special reference to the effect of vehicles. *J. Invest. Derm.*, 1945, 6, p. 43-61.
- MAC-KENNA R. M. B., WHEATLEY V. R., WORMALL A. — The composition of the surface skin fat (sebum) from the human forearm. *J. Invest. Derm.*, 1950, 15, p. 33-47.
- MAC-PHAIL M. K., ADIE P. A. — Penetration of radioactive isopropylmethylphosphonofluoridate (sarin) vapor through skin. *Canad. J. Biochem. Physiol.*, 1960, 38, p. 935-944.
- MALI J. W. H. — The transport of water through the human epidermis. *J. Invest. Derm.*, 1956, 27, p. 451-469.
- MALKINSON F. D. — Radioisotope techniques in the study of percutaneous absorption. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 1956, 7, p. 109-122.
- MALKINSON F. D., FERGUSON E. H., WANG M. C. — Percutaneous absorption of cortisone - ^{14}C through normal human skin. *J. Invest. Derm.*, 1957, 28, p. 211-216.
- MALKINSON F. D. — The percutaneous absorption of carbon 14 labeled steroids by use of a gas flow cell. *J. Invest. Derm.*, 1958, 31, p. 19-28.
- MALKINSON F. D. — Percutaneous absorption of adrenal steroids. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 1960a, 11, p. 146-160.
- MALKINSON F. D. — Percutaneous absorption of toxic substances in industry. *A. M. A. Arch. Indust. Health*, 1960b, 21, p. 87-99.
- MARZULLI F. N., TREGGAR R. T. — Identification of a barrier layer in the skin. *J. Physiol., London*, 1961, 157, p. 52p-53p.
- MASRY E. L., SMITH J. N., WILLIAMS R. T. — Studies in detoxication: the metabolism of alkylbenzenes, *n*-propylbenzene. and *n*-butylbenzene with further observations on éthylbenzene. *Biochem. J.* 1956, 64, p. 50-56.
- MASSINI P. — Self-absorption correction for isotopes emitting weak beta rays. *Science N. Y.*, 1961, 133, p. 877-878.
- MEYER F., KERK L. — Vergleichende Untersuchung zur Durchlässigkeit der Haut für einige aliphatische Tragersubstanzen. *Arch. Exp. Path. Pharmacol.*, 1959, 235, p. 267-278.

- MEYER F., MEYER E., KERK L. — Die Durchlässigkeit der Haut für ausgewählte aliphatisch und alicyclische Trägersubstanzen. *Arzneim. Forsch.*, 1959, 9, p. 430-432.
- MEYER F. — Untersuchungen über die percutane Resorbierbarkeit von Digitaloiden. *Arch. Exp. Path. Pharmac.*, 1959, 236, p. 238-239.
- MEYER F., KERK L. — Über die percutane Resorption von Eserin aus Benzol und einigen verwandten Lösungsmitteln. *Arch. Toxikol.*, 1960, 18, p. 131-139.
- MEYER F., KERK L., MEYER E. — Einfluss verschiedener Versuchsbedingungen auf die percutane Resorption., *Arch. Int. Pharmacodyn.*, 1960, 75, p. 486-501.
- MEYER F. — Percutane resorptionsvermittlung von Farbstoffen. *Arch. Exp. Path. Pharmac.*, 1962, 243, p. 326.
- MILLS I. W., KURTZ S. S., HEYEN A. H., LIPKIN M. R. — Determination of total aromatic plus olefin by sulfonation in the presence of phosphorus pentoxide. *Analyt. Chem.*, 1948; 20, p. 333-338.
- MONTAGNA W., NOBACK C. R. — Histochemical observations on the sebaceous glands of the rat. *Amer. J. Anat.*, 1947, 81, p. 39-60.
- MONTAGNA W., NOBACK C. R., ZAK P. G. — Pigment lipids and other substances in the glands of the external auditory meatus of man. *Amer. J. Anat.*, 1948, 83, p. 409-436.
- MONTAGNA W. — The structure and function of skin. *Academic press inc. Publishers*, New York, 1956 et 1962.
- MONASH S. — Location of the superficial epithelial barrier to skin penetration. *J. Invest. Derm.*, 1957, 29, p. 367-377.
- MORELLE J. — Traité de biochimie cutanée. *Edition Varia*, Paris, 1957.
- MOSS G. — A simple device for the rapid routine liberation and trapping of $^{14}\text{CO}_2$ for scintillation counting. *Int. J. Appl. Rad. Isotopes*, 1961, 11, p. 47-48.
- NEESBY T. E., PIRCIO A. W., GRATTAN J. F. — The absorption of sulfur compounds from externally deposited polythionates by the skin of the rat. *J. Amer. Pharm. Ass. (sc. Ed.)*, 1957, 46, p. 263-266.
- NENCKI M., GIACOSA D. — Ueber die oxydation der aromatischen Kohlenwasserstoffe im Thierkörper. *Z. Physiol. Chem.*, 1880, 4, p. 325-338.
- NICLOUX M. — Teneur respective en chloroforme des globules et du plasma sanguin pendant l'anesthésie. *C. R. Soc. Biol.* 1906, 60, p. 248-250.
- NICOLAIDES N., WELLS G. C. — On the biogenesis of the free fatty acids in human skin surface fat. *J. Invest. Derm.*, 1957, 29, p. 423-433.
- OSBURN O. L., WERKMAN C. H. — Determination of carbon in fermented liquors. *Indust. Engng. Chem. (anal.)*, 1932, 4, p. 421-423.
- OVERMAN R. T., CLARK H. M. — Radioisotope techniques. *Mc Graw-Hill Book company inc.*, New-York, 1960.
- PAPPENHEIMER J. R., HEISEY S. R., JORDAN E. F. — Active transport of diodrast and phenol sulfone phtaleine from cerebrospinal fluid to blood. *Amer. J. Physiol.*, 1961, 200, p. 1-10.
- PARISOT M. L. — Sur le rôle de l'épiderme en présence de l'eau, de chloroforme, de l'éther pur. *C. R. Acad. Sci.*, 1863, 57, p. 373-375.
- PARKE D. V., WILLIAMS R. T. — Studies in detoxication. 49 : The metabolism of benzene countaining ^{14}C -1-benzene. *Biochem. J.*, 1953, 54, p. 231-238.
- PELLERIN P. — Technique d'autoradiographie à très basse température. *C. R. Acad. Sci.*, 1957, 244, p. 1555-1557.
- PETERS J. H., GUTMANN H. R. — Micromethod for measurement of carbon-14 labeled material. *Anal. Chem.*, 1953, 25, p. 987-988.
- PICHOTKA J., MAYER K. — Experimentelle Untersuchungen über die Percutane Wirksamkeit gerinnungshemmender Substanzen. *Arzneim. Forsch.*, 1954, 4, p. 277-282.
- PINSON E. A. — Water exchanges and barriers as studies by the use of hydrogen isotopes. *Physiol. Rev.* 1952, 32, p. 123-134.
- PINKUS H. — Examination of the epidermis by the strip methods of removing horny layers. *J. Invest. Derm.*, 1951, 16, p. 383-386.

- PLEIN J. B., PLEIN E. M. — A comparison of *in vivo* and *in vitro* tests for the absorption, penetration and diffusion of some medicinals from silicone and petrolatum ointments bases. *J. Amer. Pharm. Ass. Sci. Ed.*, 1957, 46, p. 705-715.
- REID R. L., LEDERER M. — Separation and estimation of saturated C₂₂, C₇ fatty acids by paper partition chromatography. *Biochem. J.*, 1951, 50, p. 60-67.
- REIN H. — Experimentelle Studien über Electroendosmose an überlebender menschlicher Haut. *Z. Biol.*, 1924, 81, p. 125-140.
- ROTH L. J., LEIFER E., HOGNESS J. R., LANGHAM W. H. — Studies on the metabolism of radioactive nicotinic acid, nicotinamide in mice. *J. Biol. Chem.*, 1948, 176, p. 249-257.
- ROTHMAN S. — The principles of percutaneous absorption. *J. Lab. Clin. Med.*, 1943, 28, p. 1305-1321.
- ROTHMAN S., FLESCH P. — The physiology of the skin. *Ann. Rev. Physiol.*, 1944, 6, p. 195-224.
- ROTHMAN S. — Physiology and biochemistry of the skin (1 vol.). *The university of Chicago press*, Chicago 1954.
- RUBIN S. H. — Percutaneous absorption of vitamins. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 1960, 11, p. 160-169.
- RUGGIERO J. S., SKAUEN D. M. — Chick embryo technique for the evaluation of absorption of radioactive sodium iodide from ointment bases. *J. Pharm. Sci.*, 1962, 51, p. 233-235.
- SAGAMI S. — Studies on the structure and the function of human skin. III. The dermo epidermal junction. *Med. J. Osaka Univ.*, 1959, 10, p. 253-265.
- SCHANKER L. S., NAFPLIOTIS P. A., JOHNSON J. M. — Passage of organic bases into human red cells. *J. Pharmacol.*, 1961, 133, p. 325-331.
- SCHMIDT C. H., AGREE F., BOWMAN M. C. — Fate of C-14 diethyltoluamide applied to guinea pig. *J. Econ. Ent.*, 1959, 52, p. 928-930.
- SCHÜTZ E. — Wirkungen organischer Flüssigkeiten auf die Haut. *Arzneim. Forsch.*, 1960, 10, p. 1027-1029.
- SCOTT A., KALZ F. — The penetration and distribution of C-14 hydrocortisone in human skin after its topical application. *J. Invest. Derm.*, 1956, 26, p. 149-158.
- SCOTT A. — Behaviour of radioactive griseofulvin in skin. *Nature, Lond.*, 1960, 187, p. 705-707.
- SHARPE J., TAYLOR D. — Mesure et détection des rayonnements nucléaires. *Dunod*, Paris, 1958.
- SHELLEY W. B., ARTHUR R. P. — The physiology of the skin. *Annu. Rev. Physiol.*, 1958, 20, p. 179-206.
- SHELMIRE J. B. — Observations on the role of vehicles in percutaneous penetration. *AMA Arch. Derm.*, 1958, 78, p. 191-195.
- SHELMIRE J. B. — Factors determining the skin-drug-vehicle relationship. *AMA Arch. Derm.*, 1960, 82, p. 24-31.
- SKAUEN D. M., CYR G. N., CHRISTIAN J. E., LEE C. O. — A study of the absorption of radioactive sodium iodide from a variety of ointment bases. *J. Amer. Pharm. Ass. (sc. Ed.)*, 1949, 38, p. 618-619.
- SMITH J. G., FISCHER R. W., BLANK H. — The epidermal barrier. A comparison between scrotal and abdominal skin. *J. Invest. Derm.*, 1961, 36, p. 337-343.
- SMITH J. N., SMITHIS R. H., WILLIAMS R. T. — Studies in detoxication. 55). The metabolism of alkylbenzenes, a) glucuronic acid excretion following the administration of alkylbenzenes, b) elimination of toluene in the expired air of rabbits. *Biochem. J.*, 1954, 56, p. 317-320.
- SNIDER B. L., GOTTSCHALK H. R., ROTHMAN S. — The fate of choline in normal and pathologic keratinisation. *J. Invest. Derm.*, 1949, 13, p. 323-324.
- SNOECK J. — Le placenta humain, aspects morphologiques et fonctionnels. *Masson et Cie*, Paris 1958 (1 vol.).

- SOBEL H. — Squalene in sebum and sebum like materials. *J. Invest. Derm.*, 1949, 13, p. 333-338.
- SOBRIN E. — Etude de l'absorption percutanée chez le Rat d'un certain nombre d'huiles animales et végétales, ainsi que des esters éthyliques d'acides gras en dérivant. *Thèse de Pharmacie*, Paris 1962.
- SORBY D. L., PLEIN E. M. — A radiometric method for determination of absorption of ammoniated mercury from ointments. *J. Amer. Pharm. Ass. (Sc. Ed.)*, 1959, 48, p. 308-310.
- SPECTOR W. S. — Handbook of biological data (1 vol.), W. S. Saunders Co, Philadelphia and London 1956.
- STOLAR M. E., ROSSI G. V., BARR M. — The effect of various ointment bases on the percutaneous absorption of salicylate. *J. Amer. Pharm. Ass. (Sc. Ed.)*, 1960, 49, p. 144-147.
- STOUGHTON R. B., CLENDENNING W. E., KRUSE D. — Percutaneous absorption of nicotinic acid and derivatives. *J. Invest. Derm.*, 1960, 35, p. 337-341.
- STRAKOSCH E. A., CLARK W. G. — Studies on the penetration of sulfonamides in the skin. 1) Penetration of sulfonamides from various ointment bases into the intact skin of guinea pigs, and a new method of analysis of tissues sulfonamides. *Amer. J. Med. Sci.*, 1943, 205, p. 518-524.
- STÜTTGEN G., WÜST H. — Die Resorption von elementarem Schwefel durch die Haut. *Hautarzt*, 1955, 6, p. 172-175.
- STÜTTGEN G., BETZLER H. — Zur Frage der Permeation von Elektrolyten durch die Haut. 1) Vitro versuche mit radioaktivmarkierten Ca^{++} , SO_4^{--} und PO_4^{3-} Ionen an Meerschweinchen und Mäusehaut. *Arch. Klin. Exp. Derm.*, 1956, 203, p. 472-482.
- STÜTTGEN G., BETZLER H. — Zur Frage der Permeation von Elektrolyten durch die Haut. II) In vitro und in vivo Versuche an menschlicher Haut mit $^{45}\text{Ca}^{++}$. *Arch. Klin. Exp. Derm.*, 1957, 204, p. 165-174.
- STÜTTGEN G., KRAUSE H. — Der Nachweis von Tritium markiertem Vitamin A in den Schichten der Haut nach lokaler Application. *Hautarzt*, 1959, 11, p. 504-506.
- STÜTTGEN G., KRAUSE H. — Die percutane Absorption von Tritium markiertem Panthenol bei Mensch und Tier. *Arch. Klin. Exp. Derm.*, 1960, 209, p. 578-582.
- SULZBERGER M. B., HERRMANN F. — Some new observations on the biology of the skin surface. *Arch. Derm.*, 1960, 81, p. 235-244.
- SWICK R. W., BUCHENAN D. L., NAKAO A. — Ethylenediamine, a carbonate free alkali for carbon dioxide absorption. *Anal. Chem.*, 1952, 24, p. 2000-2001.
- SZAKALL A. — Hautphysiologische Forschung und gesunderhaltung der Haut. *Fette Seifen Anstrichmittel*, 1951, 53, p. 399-405.
- SZAKALL A., SCHULZ K. H. — Die Permeation von Fettalkohol sulfaten und Natriumseifen definierter Kettenlänge ($\text{C}_8\text{-C}_{18}$) in die intakte menschliche Haut, ihr Zusammenhang mit den Riezwirkungen. *Fette Seifen Anstrichmittel*. 1960, 62, p. 170-175.
- TAS M. D., FEIGE Y. — Penetration of radioiodide (I-131) through human skin. *J. Invest. Derm.*, 1958, 30, p. 193-196.
- TRAUTMANN A., FIEBIGER J. — Fundamentals of the histology of domestic animals. *Comstock publishing associates, a division of Cornell university press*, Ithaca, New York, 1952.
- TRAVELL J. — Absorption of nicotine from various sites. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1960, 90, p. 13-30.
- TREADWELL F. P., HALL W. T. — Analytical chemistry : *John Wiley and sons*, New York, 1942.
- TREHERNE J. E. — The permeability of skin to some non electrolytes. *J. Physiol. Lond.*, 1956, 133, p. 171-180.

- TREGGAR R. T. — The epidermis as a thick membrane. *J. Physiol. Lond.* 1960, 153, p. 54p-55p.
- TREGGAR R. T. — Relative permeability of hair follicles and epidermis. *J. Physiol. Lond.*, 1961, 156, p. 307-313.
- TREGGAR R. T. — The structures which limit the penetrability of the skin. *J. Soc. Cosmet. chem.*, 1962, 13, p. 145-151.
- TRUHAUT R. — Microdosage spécifique du benzène dans les milieux biologiques. *Arch. Mal. Prof.*, 1956 ; 17, p. 221-227.
- TSANEY R. G. — Nucleic acid content in mouse epidermis separated from dermis by different methods. *Experimentia*, 1960, 16, p. 448-449.
- UMBREIT W. W., BURRIS R. H., STAUFFER J. F. — Manometric techniques and tissue metabolism. *Burgess publishing Co*, Minneapolis 15, Minn, 1951.
- ULLBERG S. — Studies on the distribution and fate of S-35 labelled benzylpenicillin in the body. *Acta Radiol., Stockh.*, 1954, suppl. 118.
- VALDIGUIE M. P., MESTRE A. — Sur une cause d'erreur dans la recherche de l'acétonurie pathologique, l'absorption cutanée et pulmonaire de l'acétone. *Ann. Biol. Clin.*, 1944, 2, p. 11-13.
- VALETTE G., CAVIER R. — Sur un test physiologique utilisable pour l'étude de la vitesse d'absorption d'un médicament. *C. R. Soc. Biol.*, 1950, 144, p. 825-827.
- VALETTE G., CAVIER R. — Sur un test physiologique applicable à l'étude de la vitesse d'absorption d'un médicament. *J. Physiol. Paris*, 1951, 43, p. 41-46.
- VALETTE G. — Les conditions physicochimiques de l'absorption cutanée. *J. Physiol., Paris*, 1954, 46, p. 51-98.
- VALETTE G., CAVIER R. — Absorption percutanée et constitution chimique, hydrocarbures, alcools, esters. *Arch. Int. Pharmacodyn.*, 1954, 97, p. 232-240.
- VALETTE G., CAVIER R., SAVEL J. — Les facteurs physiques de l'absorption cutanée des liquides organiques, hydrocarbures, alcools, esters. *Arch. Int. Pharmacodyn.*, 1954a, 97, p. 241-250.
- VALETTE G., CAVIER R., SAVEL J. — Les facteurs physiques réglant l'absorption des substances à travers la peau. *Thérapie*, 1954b, 9, p. 49-53.
- VALETTE G., CAVIER R., TRUHAUT R., RUCARD G. — La pénétration des solvants organiques à travers la peau, cas des hydrocarbures et des dérivés chlorés. Hommage au Doyen R. FABRE, *Sedes*, Paris, 1956. p. 431-437.
- VALETTE G., HUERRE M. — Etude de différentes méthodes pharmacodynamiques applicables à l'évaluation de l'absorption cutanée des excipients pour pommades. *Ann. Pharm. Franc.*, 1957, 15, p. 601-611.
- VALETTE G., HUERRE M., ZIZINE L. — Importance de la nature du véhicule sur l'activité des pommades à base de corticostéroïdes. *Ann. Pharm. Franc.*, 1958, 16, p. 397-402.
- VALETTE G., COHEN Y., WEPIERRE J. — Résorption pulmonaire et localisation chez la Souris du *p*-cymène marqué au carbone 14. *C. R. Acad. Sci.*, 1962, 255, p. 596-598.
- VAN SCOTT E. J., LYON J. B. — A chemical measure of the effect of soaps and detergents on the skin. *J. Invest. Derm.*, 1953, 21, p. 199-203.
- VAN NIEUWENBERG C. J., HEGGE L. A. — On the absorption of carbon dioxide by baryta in an organic solvent. *Anal. Chem. Acta*, 1951, 5, p. 68-70.
- VAN SLYKE D., FOLCH J. — Manometric carbon determination. *J. Biol. Chem.*, 1940, 136, p. 509-541.
- VAN SLYKE D., PLAZIN J., WEISIGER R. J. — Reagents for the Van Slyke Folch wet carbon combustion. *J. Biol. Chem.*, 1951, 191, p. 299-304.
- VINSON L. J., CHOMAN B. R. — Percutaneous absorption and surface active agents. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 1960, 11, p. 127-137.

- VON KENNEL J., KUTZIM H. — Hautresorption versuche mit radioaktiven Isotopen. *Fette Seifen Anstrichmittel*, 1959, 61, p. 374-376.
- WALKER L. A., LOUGHEED R. — A simple method for the assay of carbon 14 in compounds or mixtures. *Int. J. Appl. Rad. Isotopes, USA*, 1962, 13, p. 95-97.
- WEITKAMP A. W., SMILJANIC A. M., ROTHMAN S. — The free fatty acids of human hair fat. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1947, 69, p. 1936-1939.
- WEPIERRE J., VALETTE G. — La traversée de la barrière lipidique cutanée chez le Chien par un solvant lipophile, le *p*-cymène marqué au carbone 14. *C. R. Acad. Sci.*, 1962, 254, p. 2092-2094.
- WEPIERRE J. — Etude quantitative de la pénétration percutanée chez la Souris d'un solvant lipophile, le *p*-cymène marqué au carbone 14. *C. R. Acad. Sci.*, 1963, 256, p. 1628-1630.
- WEPIERRE J. — Mesure de l'absorption percutanée et du transport sanguin du *p*-cymène ^{14}C *in vivo* chez le Lapin. *C. R. Acad. Sci.*, 1963, 256, p. 4529-4532.
- WERNSDÖRFER R. — Untersuchungen über die percutane Resorption von $^{203}\text{HgCl}_2$. *Klin. Wschr.*, 1955, 33, p. 626.
- WILLIAMS R. T. — Detoxication mechanism: the metabolism of drugs and allied organic compounds. *Chapman and Hall*, London 1959.
- WILZBACH K. E. — Tritium labelling by exposure of organic compounds to tritium gas. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1957, 79, p. 1013.
- WINTERNITZ R. — Zur lehre von der Hautresorption. *Arch. Exp. Path. Pharmak.*, 1891, 28, p. 405-422.
- WITTE S., BRESSEL D. — Thrombininhibitoranstieg im Blut nach percutaner heparinoïdanwendung. *Klin. Wschr.*, 1960, 38, p. 501.
- WITTEN V. H., ROSS M. S., OSHRY E., HOLMSTROM V. — Studies of thorium X applied to human skin. II) Comparative findings of the penetration and localisation of thorium X when applied in alcoholic solution, in ointment and in lacquer vehicles. *J. Invest. Derm.*, 1953, 23, p. 93-103.
- WOLF J. — Das Oberflächenrelief der menschlichen Haut. *Z. Mikr. Anat. Forsch.*, 1940, 47, p. 351-400.
- WURSTER D. E., DEMPSKI R. E. — Permeability of excised human keratin to lipid soluble substances. *J. Pharm. Sci.*, 1961, 50, p. 588-591.
- WURSTER D. E., KRAMER S. F. — Investigation of some factors influencing percutaneous absorption. *J. Pharm. Sci.*, 1961, 50, p. 288-293.
- YANKWICH P. F., NORRIS T. H., HUSTON J. — Correcting for the absorption of weak β particles in thick samples. General method for use in tracer work. *Anal. Chem.*, 1947, 19, p. 439-441.

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

Absorption intestinale des sucres.

Vu et approuvé :

Paris, le 6 décembre 1963

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

Marc ZAMANSKY

Vu et Permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

Jean ROCHE

